



Etude de la voie de biosynthèse du folate : caractérisation biochimique et recherche d'inhibiteurs de la formation de l'acide para-aminobenzoïque

Djeneb Camara

► To cite this version:

Djeneb Camara. Etude de la voie de biosynthèse du folate : caractérisation biochimique et recherche d'inhibiteurs de la formation de l'acide para-aminobenzoïque. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV044 . tel-00656126

HAL Id: tel-00656126

<https://theses.hal.science/tel-00656126>

Submitted on 3 Jan 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Djeneb CAMARA

Thèse dirigée par **Fabrice REBEILLE** et
codirigée par **Renaud DUMAS**

préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire
Végétale**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude de la voie de biosynthèse du folate : caractérisation biochimique et recherche d'inhibiteurs de la formation de l'acide *para*-aminobenzoïque

Thèse soutenue publiquement le **30 septembre 2011**,
devant le jury composé de :

Madame Christelle BRETON

Professeur Université de Grenoble (Présidente)

Monsieur Laurent LEGENDRE

Professeur Université Jean Monnet (Rapporteur)

Monsieur Michel LEBRUN

Professeur Université Montpellier (Rapporteur)

Monsieur Thierry GAUDE

Directeur Recherche CNRS, ENS-Lyon (Membre)

Madame Marie-France CESBRON-DELAU

Directeur Recherche CNRS, Université de Grenoble (Membre)

Monsieur Fabrice REBEILLE

Directeur Recherche CEA, CEA-Grenoble (Membre)



**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
-GRENOBLE I-**

Spécialité
BIOLOGIE

Présentée par
Djeneb CAMARA

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER –GRENOBLE I

**ETUDE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DU FOLATE : CARACTERISATION
BIOCHIMIQUE ET RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA FORMATION DE
L'ACIDE PARA-AMINOBENZOÏQUE**

**Directeur de thèse : Fabrice REBEILLE
Co-directeur de thèse : Renaud DUMAS**

Soutenue le vendredi 30 septembre 2011 devant le jury composé de :

Michel LEBRUN	Rapporteur
Laurent LEGENDRE	Rapporteur
Thierry GAUDE	Examineur
Christelle BRETON	Présidente
Marie-France CESBRON-DELAUW	Examinatrice
Fabrice REBEILLE	Directeur de thèse

A ma mère Fanta Coulibaly, une femme exceptionnelle,

AVANT-PROPOS

Je remercie Mme Marilyn VANTARD de m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse au sein du laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale. Je remercie également Mr Norbert ROLLAND de m'avoir renouvelé sa confiance après avoir pris la direction du Laboratoire.

Je remercie du fond du cœur Mr Fabrice REBEILLE de m'avoir encadrée pendant ces quatre années de thèse. Aucun mot ne peut exprimer ma reconnaissance pour le soutien sans faille qu'il m'a accordé. J'associe à ces remerciements Mr Renaud DUMAS, co-directeur de ma thèse, nos nombreuses discussions ont beaucoup fait avancer mon travail. Tous les deux vous avez toujours été présents pour moi. « AW NI TCHE » (merci en Bambara).

J'adresse évidemment mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger mon travail: Mme Christelle BRETON, Mme Marie-France CESBRON-DELAUW, Mr Laurent LEGENDRE, Mr Michel LEBRUN et Mr Thierry GAUDE.

Je remercie également tous les membres de l'équipe métabolisme C1 : Mr Stephane RAVANEL, Mr Claude ALBAN, Mme Jacqueline MARTIN-LAFFON, Virginie PAUTRE, Morgane MINNINO, Annabelle GILGUEN, Quentin DROGUE et Sheng MA.

Un remerciement particulier à deux personnes qui ne travaillent plus au laboratoire : Mme Bernadette GAMBONNET et Mme Celine RICHEFEU. Merci infiniment Bernadette, de m'avoir soulagée bien souvent de la nostalgie de mon pays. Tu es chaleureuse et accueillante comme l'Afrique. Merci pour cette aide précieuse que tu m'as apportée dans mon travail. Merci Céline car tu as permis de débloquer le travail à un moment crucial.

Je pense également à tous les membres du laboratoire LPCV qui m'ont apporté leur aide ou qui ont contribué à créer une ambiance agréable : Sassia, Catherine, Agnès, Anne-Marie, Manu, Lucas, Daniel, Céline, Sylvianne et Sophie. Je pense sincèrement que vous êtes la colonne vertébrale du laboratoire. Merci pour cet accueil chaleureux, pour les « bonjours » et les sourires du matin, ça me réchauffait le cœur même au plus froid de l'hiver.

Je tiens particulièrement à remercier tous les « Jeunes » du laboratoire pour leur soutien au travail et hors du laboratoire, on reste en contact bien évidemment.

Je remercie tous ceux qui m'ont soutenue et que je n'ai pas cités parce qu'une page ne suffirait pas. J'ai une pensée spéciale pour Eric MARECHAL et Maryse BLOCK.

SOMMAIRE

INTRODUCTION et SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....1

I.	Folate et métabolisme C1 chez les plantes.....	2
A.	Folates.....	2
1.	Biosynthèse du tétrahydrofolate chez les plantes.....	4
a.	Biosynthèse des précurseurs.....	5
a1.	Noyau ptérine.....	5
a2.	Acide <i>para</i> -aminobenzoïque.....	6
b.	Assemblage des précurseurs.....	6
c.	Réduction et polyglutamination.....	7
2.	Catabolisme et recyclage.....	8
a.	Recyclage du pABA-glu.....	9
b.	Recyclage du noyau ptérine.....	9
3.	Trafic intracellulaire.....	9
B.	Métabolisme C1.....	10
1.	Origine des unités monocarbonées.....	11
a.	Sérine et glycine.....	11
a1.	Sérine.....	11
a2.	Glycine.....	12
b.	Formate.....	13
2.	Interconversion des unités monocarbonées.....	14
3.	Les principales voies métaboliques impliquant le métabolisme C1.....	15
a.	La synthèse de méthionine.....	15
b.	Le cycle des méthylations.....	17
c.	La synthèse des nucléotides.....	18
c1.	AMP et GMP.....	19
c2.	Thymidilate.....	20
II.	Biosynthèse du THF : les applications.....	20
A.	Conséquences d'une carence en folate.....	20
B.	Comparaison des voies de biosynthèse du THF chez diverses espèces modèles.....	23
C.	La filiation plante-apicomplexes.....	25
1.	Définition des apicomplexes.....	25
2.	La théorie de l'endosymbiose.....	26
3.	Extrapolation du modèle plante vers les apicomplexes.....	28
D.	La voie de biosynthèse du THF : une cible antibiotique, herbicide et antiparasitaire.....	28
1.	La toxoplasmose et le paludisme : deux maladies causées par des parasites du <i>phylum</i> apicomplexe.....	29
a.	La toxoplasmose.....	29

b.	Le paludisme.....	29
2.	Les enzymes ciblées et les molécules efficaces.....	30
a.	Inhibiteurs de la dihydroptéroate synthase.....	30
b.	Inhibiteurs de la dihydrofolate reductase.....	32
3.	La résistance aux inhibiteurs.....	33
III.	La voie de biosynthèse du pABA : une cible potentielle.....	34
A.	Les enzymes impliquées.....	34
1.	L'ADC synthase.....	34
2.	L'ADC lyase.....	39
B.	Recherche d'inhibiteurs de l'ADC synthase.....	40
IV.	Objectifs de ce travail.....	42

MATERIEL ET METHODES.....43

I.	Surexpression et purification des protéines recombinantes en système bactérien.....	44
A.	Clonage dans les vecteurs d'expression pet28b ⁺ et pet21b ⁺	44
B.	Surexpression des protéines recombinantes en système bactérien.....	44
1.	Expression des ADC synthase (GAT-ADCS).....	44
2.	Expression de l'ADC lyase (ADCL).....	45
3.	Expression des protéines à domaines GAT.....	45
C.	Purification et dosage des protéines recombinantes.....	45
1.	Purification sur résine Ni-NTA.....	45
2.	Purification par chromatographie de partage.....	46
3.	Dénaturation des protéines à l'urée 8M.....	46
4.	Renaturation des protéines sur boudin de dialyse.....	46
5.	Dosage de la quantité de protéine.....	47
6.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-page.....	47
II.	Mesure de l'activité enzymatique des GAT-ADCS et ADCL.....	47
A.	Mesure des activités GAT-ADCS et ADCL par absorbance.....	47
1.	Mesure de l'activité du domaine GAT de la GAT-ADCS couplée avec l'activité de la glutamate déshydrogénase(GDH).....	49
2.	Mesure des activités GAT-ADCS et ADCL couplées avec celle de la lactate déshydrogénase (LDH).....	49
B.	Mesure des activités GAT-ADCS et ADCL par fluorescence.....	50
1.	Mesure de l'activité du domaine GAT de la GAT-ADCS couplée avec celle de la glutamate déshydrogénase.....	50
2.	Mesure du couplage des activités GAT-ADCS et ADCL.....	51
C.	Mesure de l'activité GAT-ADCS et ADCL en RMN.....	51
III.	Criblage à Haut débit.....	52
A.	Mesure de l'activité.....	52

1.	La plateforme de criblage du CMBA.....	52
2.	Mise au point du test pour le criblage à haut débit.....	53
B.	Criblage primaire et secondaire.....	55
IV.	Organismes modèles étudiés et méthodes de culture : <i>A. thaliana</i> , <i>T. gondii</i> , <i>P. falciparum</i> et fibroblastes humains.....	55
A.	Préparation de la solution d'éseroline.....	56
B.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	56
1.	Culture de plantules d' <i>A. thaliana</i>	56
2.	Culture de cellules d' <i>A. thaliana</i>	56
C.	Fibroblaste humains et <i>Toxoplasma Gondii</i>	57
1.	Invasion synchronisée des cellules hôtes par <i>T. gondii</i>	57
2.	Traitement en présence de composés candidats antiparasitaire.....	58
a.	Le test d'invasion.....	59
b.	Le test de prolifération.....	59
D.	<i>Plasmodium falciparum</i>	59
V.	Dosage de la teneur en folate et en pABA dans des cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en culture.....	59
A.	Dosage de la teneur en pABA dans les cellules par HPLC.....	59
1.	Préparation des échantillons de cellules.....	59
2.	Conditions du dosage HPLC et détection du pABA.....	60
B.	Dosage de la teneur en folate dans les cellules par LC-MS/MS.....	61
1.	Préparation des échantillons.....	61
2.	Dosage du folate par LC-MS/MS.....	61

RESULTATS.....62

Chapitre I : la synthèse de l'acide *para*-aminobenzoïque : mécanisme réactionnel et propriétés biochimiques de l'enzyme bifonctionnelle glutamine amidotransférase/aminodeoxychorismate synthase.....63

I.	Comparaison des séquences des ADC synthases de différentes espèces.....	64
A.	Analyse et comparaison des séquences.....	64
B.	Arbre phylogénétique des ADC synthase (GAT-ADCS).....	72
II.	Surproduction des GAT-ADCS recombinantes.....	74
A.	Surproduction de la GAT-ADCS de <i>P. falciparum</i>	74
B.	Surproduction de la GAT-ADCS de <i>T. gondii</i>	74
C.	Surproduction de la GAT-ADCS de <i>A. thaliana</i>	77
1.	Surproduction dans un système d'expression bactérien.....	77
2.	Etude de la stabilité par thermo-fluorescence des formes courte et longue de la GAT-ADCS d' <i>A. thaliana</i>	78
3.	Etude de la stabilité au cours du temps par dosage d'activité des formes courte et longue de la GAT-ADCS d' <i>A. thaliana</i>	80
4.	Discussion.....	80

III.	Propriétés cinétique de la GAT-ADCS d' <i>A. thaliana</i>	82
IV.	Conclusion.....	91

Chapitre II Inhibition de la biosynthèse de l'acide <i>para</i> -aminobenzoïque et impact sur la croissance des plantules d' <i>A. thaliana</i> et des parasites <i>T. gondii</i> et <i>P. falciparum</i>	93
---	----

I.	Recherche d'inhibiteurs spécifiques de la GAT-ADCS par des approches de criblage à haut débit.....	94
	A. Le criblage.....	95
	B. La rubreserine inhibiteur de la GAT-ADCS.....	98
	C. L'éseroline et la rubreserine sont des produits de dégradation de la physostigmine.....	100
II.	Inhibition de la biosynthèse du pABA par la rubreserine chez les plantes et les apicomplexes : conséquences pour la croissance des plantes et la prolifération des parasites.....	102
III.	Conclusion.....	125

PERSPECTIVES.....128

I.	La voie de biosynthèse du pABA.....	129
II.	L'inhibition de la biosynthèse du pABA.....	130

REFERENCES.....131

ANNEXES.....142

ABREVIATION

5-FTHF	5-formyl-tetrahydrofolate
ADC	aminodeoxychorismate
ADCL	aminodeoxychorismate lyase
ADCS	aminodeoxychorismate synthase
ADN	acide desoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AMP	adénosine monophosphate
ARN (m)	acide ribonucleique (messenger)
ARN (t)	acide ribonucleique (transfert)
AS	anthranilate synthase
AtGAT-ADCS	ADC synthase d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenine triphosphate
C1	unité monocarboné
DHF	dihydrofolate
DHFR	dihydrofolate reductase
DHPS	dihydropteroate synthase
DTT	dithiothréitol
GAT-ADCS	glutamine amidotransferase-aminodeoxychorismate synthase
GAT	glutamine aminotransferase
GDH	glutamate déshydrogenase
GMP	guanosine monophosphate
GMPS	guanosine monophosphate synthase
GTP	guanosine triphosphate
H ₂ F	dihydrofolate
H ₄ F	tetrahydrofolate
H ₄ F-glu _n	tetrahydrofolate polyglutaminé
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	concentration inhibitrice à 50%
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kb	kilo paire de bases
k _{cat}	constante catalytique
kDa	kilodalton

K_m	constante de Michaelis-Menten
K_i	constante d'inhibition
LDH	lactate déshydrogenase
NAD/ NADH ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée/forme réduite)
pABA	acide <i>para</i> -aminobenzoïque
PCR	polymerase chain reaction
PfGAT-ADCS	ADC synthase de <i>Plasmodium falciparum</i>
Pyrim	Pyriméthamine
RMN	résonance magnétique nucléaire
Rubre	rubreserine
SDZ	sulfadiazine
Sulfa	sulfamnilamide
TgGAT-ADCS	ADC synthase de <i>Toxoplasma gondii</i>
THF	tetrahydrofolate
TS	thymidylate synthase
V_m	vitesse maximale

INTRODUCTION

I. Folate et métabolisme C1 chez les plantes

A. Folates

Le terme folate(s) désigne un ensemble de molécules qui ont pour structure de base l'acide folique (ou acide ptéroylglutamique). Il s'agit d'une molécule composée de trois parties bien distinctes : un noyau ptérine lié à un acide *para*-aminobenzoïque (pABA) sur lequel s'articule une chaîne de glutamate dont le nombre de résidus varie de 1 à 14 (Figure 1) (Rebeille et al. 2006). Cette structure de base est partagée par de nombreuses molécules qui se différencient par le niveau d'oxydation du noyau ptérine, par la nature de l'unité monocarbonée liée à la partie ptérine et/ou à la partie pABA, et également par le nombre de résidus constituant la queue polyglutamate. Au niveau cellulaire, les formes actives sont les dérivés du dihydrofolate (DHF) et du tétrahydrofolate (THF) qui sont les formes réduites de l'acide folique. Il arrive que l'acide folique (forme la plus oxydée) soit retrouvé en faibles quantités dans des dosages de folates cellulaires. Dans ce cas, il s'agit soit d'un artefact expérimental dû à la technique utilisée pour l'extraction des folates (oxydation chimique) (Zhang et al. 2005b), soit d'un processus naturel d'oxydation (Hanson et al. 1993). Cette forme oxydée correspond à la vitamine B9, et c'est elle qui est utilisée en tant que complément alimentaire. Une fois absorbée par l'organisme, elle est réduite en DHF et THF.

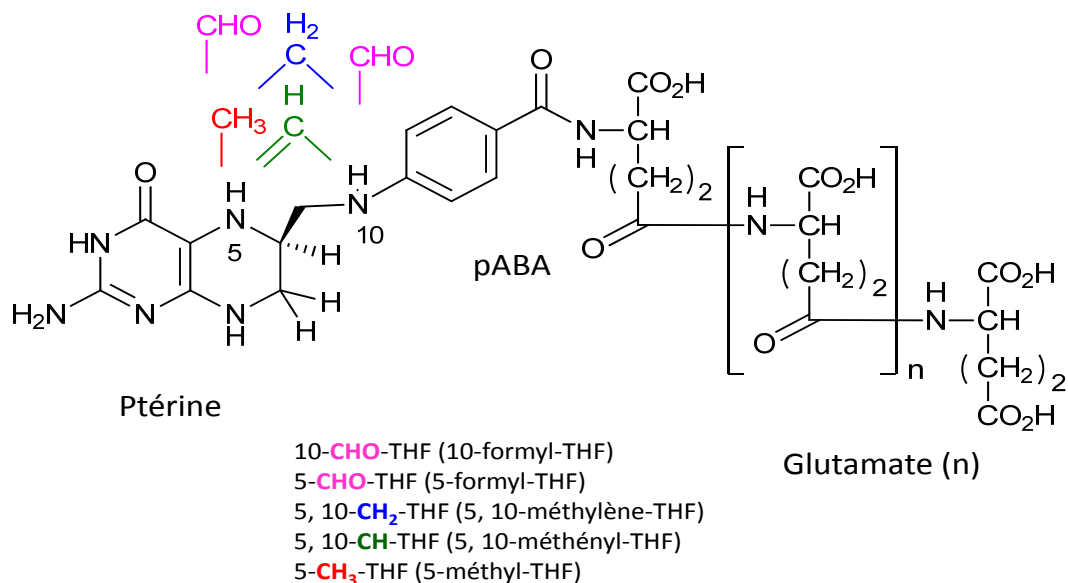


Figure 1 : Structure chimique du [6S]-tétrahydrofolate.

Seul le THF peut véhiculer des unités C1. Les unités C1 chargées sur le THF varient par leur état d'oxydoréduction. Ainsi le THF peut transporter des groupements méthyle, méthylène, méthényle et formyle. Ces unités sont liées de façon covalente au THF via les atomes d'azote N5 du noyau ptérine et / ou N10 du pABA (Figure 1). Ces différentes formes de THF sont interconvertibles (Figure 2).

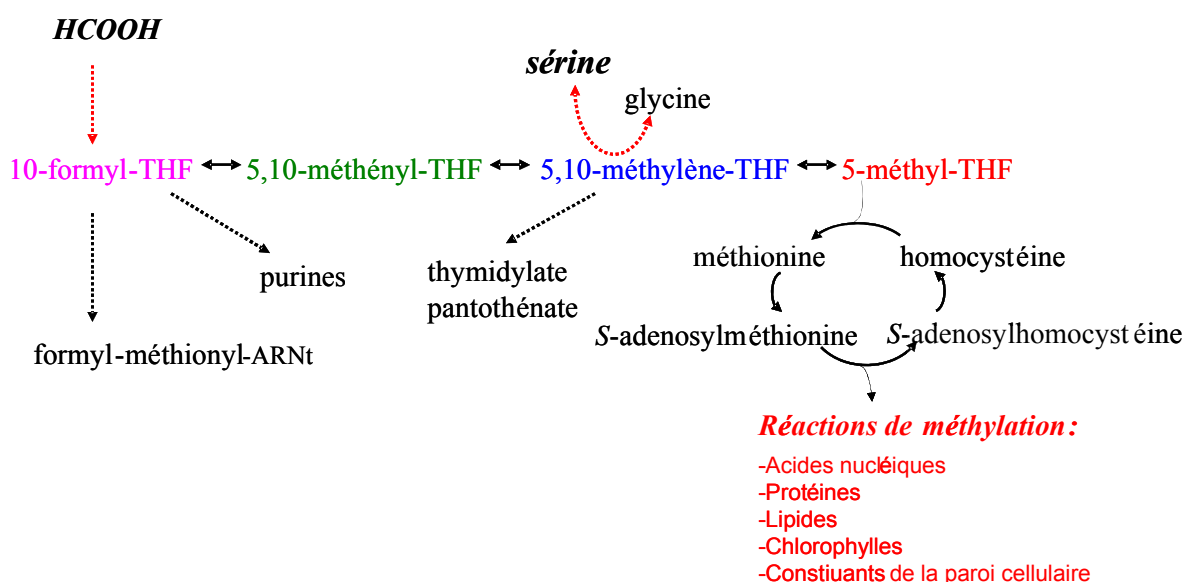


Figure 2 : réactions d'échange entre les dérivés du tétrahydrofolate (THF), et voies métaboliques dans lesquelles ces différentes formes sont impliquées. Les unités C1 peuvent être apportées soit par la sérine ou la glycine (formation de méthylène-THF), soit sous forme d'acide formique (formation de 10-formyl-THF).

Bien que la partie polyglutamate ne joue pas de rôle dans la liaison aux unités C1, elle possède tout de même une fonction importante puisque le nombre de résidus glutamate (de 1 à 14) va influencer le transport intra et intercellulaire des folates, leur stabilité et leur utilisation. En effet, la chaîne polyglutamate peut avoir un rôle dans la rétention des folates à l'intérieur de la cellule ou des différents organites. Dans les cellules animales, la forme monoglutamate est la forme préférentielle de transport à travers les membranes, la perméabilité pour les dérivés polyglutamates étant beaucoup plus faible (McGuire et Bertino 1981b). De même, chez *Arabidopsis*, la présence de l'enzyme responsable de l'allongement de la queue polyglutamate (la folylpolyglutamate synthétase) dans le cytosol, le plaste et la mitochondrie suggère un intense trafic du THF sous sa forme monoglutamate (Ravanel et al. 2001). Les propriétés cinétiques des enzymes folate-dépendantes sont également fortement influencées par la longueur de la chaîne polyglutamate. Une étude menée *in vitro* sur plusieurs enzymes folate-dépendantes a montré que celles-ci présentent une plus grande affinité pour les formes

polyglutamates que pour les formes monoglutamates (McGuire et Bertino 1981a), ce qui a aussi été confirmé *in vivo* (Strong et al. 1990). Dans les mitochondries de plantes, par exemple, l'affinité de la protéine T du complexe de la glycine décarboxylase et de la sérine hydroxyméthyltransférase pour le THF augmente fortement avec le nombre de résidus glutamate, les K_m les plus faibles étant obtenus avec 4 et 5 résidus glutamate. Or, il est intéressant de noter que les dérivés du THF dans ce même compartiment sont présents principalement sous les formes tétra- et pentaglutamylées (Besson et al. 1993). De même, les méthionines synthases, utilisent exclusivement des dérivés polyglutamylés du CH₃-THF pour réaliser la synthèse de méthionine (Ravanel et al. 2004). La présence de la chaîne polyglutamate permet également d'augmenter la stabilité des folates. En effet, la plus grande affinité que présentent les enzymes à folates vis-à-vis des formes polyglutamylées permet de protéger la molécule contre les dégradations oxydatives. Le THF est une molécule très fragile et facilement oxydable. Or, lorsque le THF est lié aux enzymes folate dépendantes, sa durée de vie se trouve considérablement allongée (Rebeille et al. 1994).

1. Biosynthèse du tetrahydrofolate chez les plantes

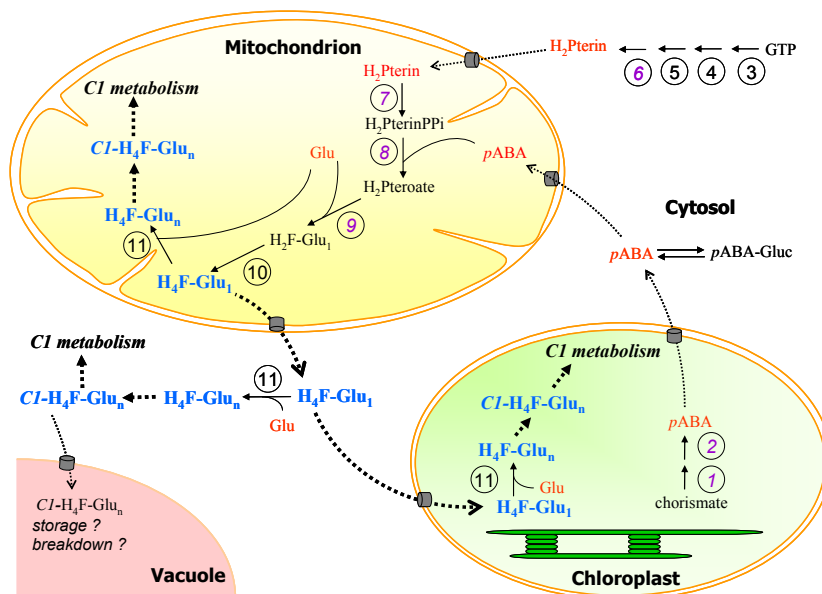


Figure 3 : Voies de biosynthèse du folate dans la plante. Les enzymes impliquées dans la synthèse du folate sont : (1) ADC synthase, (2) ADC lyase, (3) GTP cyclohydrolase I, (4) nudix hydrolase, (5) phosphatase, (6) dihydroneopterin aldolase, (7) hydroxymethyldihydropterine pyrophosphokinase, (8) dihydropteroate synthase, (9) dihydrofolate synthetase, (10) dihydrofolate reductase, (11) folypolyglutamate synthetase (Rebeille et al. 2006).

Chez les plantes, la synthèse du tetrahydrofolate présente une organisation spatiale complexe (Rebeille et al. 2006) : le noyau ptérine est synthétisé à partir de GTP dans le cytosol, le pABA provient du chorismate dans les plastes et l'association de la dihydroptérine, du pABA et du glutamate se fait dans la mitochondrie (Figure 3).

a. Biosynthèse des précurseurs

a1. Noyau Ptérine

Le noyau ptérine du THF est synthétisé dans le cytosol à partir de GTP (étapes 3 à 6, Figure 3). La GTP cyclohydrolase I (GCHI) cyclise le GTP pour former la dihydronéoptérine triphosphate (étape 3, Figure 3). La GCHI est présente chez tous les organismes capables de synthétiser le THF *de novo* mais également chez les mammifères chez qui elle est impliquée dans la synthèse du tétrahydrobioptérine (Werner-Felmayer et al. 2002), un cofacteur aussi impliqué dans le métabolisme d'acides aminés aromatiques. L'absence de peptide d'adressage sur la séquence prédite de la GCHI de plante indique que cette enzyme est cytosolique (Basset et al, 2002). La structure primaire de la GCHI de plante présente une caractéristique inédite par rapport à l'enzyme bactérienne ou animale. En effet, les séquences prédites pour la GCHI d'*Arabidopsis thaliana*, de *Medicago truncatula* et de *Lycopersicon esculentum* montrent que l'enzyme possède 2 domaines GCHI. Aucun des 2 modules ne possède une séquence GCHI complète, ainsi ils doivent être rassemblés sur un même polypeptide pour être actifs. La réaction suivante dans la synthèse du noyau ptérine consiste à éliminer la chaîne phosphate de la dihydronéoptérine triphosphate (étape 4, Figure 3). Cette étape est réalisée en deux temps : une dihydronéoptérinetriphosphate pyrophosphatase permet la formation de dihydronéoptérine monophosphate avec relargage d'un pyrophosphate. Ensuite, une phosphatase non spécifique clive le dernier phosphate pour produire une molécule de dihydronéoptérine (Klaus et al. 2005). L'étape suivante de cette voie de biosynthèse consiste alors à cliver la chaîne latérale de la dihydronéoptérine. Cette réaction est catalysée par la dihydronéoptérine aldolase (étape 6, Figure 3), ce qui permet la formation de 6-hydroxyméthyldihydroptérine tout en libérant du glycolaldéhyde. Selon une étude de 2004 (Goyer et al. 2004), il existe 3 dihydronéoptérine aldolases chez *Arabidopsis*, toutes cytosoliques compte tenu de l'absence de séquence d'adressage prédite.

a2. Acide *para*-aminobenzoïque

Dans la cellule végétale, le pABA existe sous deux formes : une forme libre et une forme conjuguée avec une molécule de glucose. Cette forme liée représente 80 % du pABA total (Quinlivan et al. 2003). Cependant, seule la forme libre est impliquée dans la synthèse du THF, la forme conjuguée ne participant pas à cette biosynthèse. Elle constitue probablement une forme de stockage du pABA à l'intérieur de la vacuole et permet ainsi de maintenir une certaine homéostasie de ce métabolite à l'intérieur de la cellule (Eudes et al. 2008)

La synthèse du pABA est décrite en détail plus loin dans ce chapitre. Elle se déroule dans le chloroplaste en deux étapes à partir du chorismate. Dans un premier temps, l'aminodésoxychorismate (ADC) synthase catalyse la formation d'ADC et de glutamate à partir de chorismate et de glutamine (étape 1, Figure 3) (Basset et al. 2004b) (Sahr et al. 2006b) (L'enzyme bifonctionnelle comprenant ces deux domaines fonctionnels est dénommée GAT-ADCS). La deuxième étape de cette synthèse consiste en un clivage de l'ADC pour donner du pABA ainsi que du pyruvate (étape 2, Figure 3). Cette réaction est catalysée par l'ADC lyase, (Basset et al. 2004c).

b. Assemblage des précurseurs

L'assemblage des précurseurs dihydroptérine et pABA a lieu dans la mitochondrie et conduit à la formation de dihydroptéroate. Cette réaction nécessite tout d'abord d'activer l'hydroxyméthyldihydroptérine par addition d'un groupe pyrophosphate. Cette opération est réalisée par l'hydroxyméthyldihydroptérine pyrophosphokinase (HPPK) (étape 7, Figure 3). Dans un second temps, la condensation du noyau ptérine et du pABA est réalisée par la dihydroptéroate synthase (DHPS) (étape 8, Figure 3). Chez les plantes, ces deux réactions sont catalysées par une enzyme bifonctionnelle, l'HPPK-DHPS, alors que chez les bactéries ces activités sont portées par deux enzymes distinctes, folK et folP (Rebeille et al. 1997). L'étape de condensation réalisée par le domaine DHPS de l'HPPK-DHPS de plante est sujette à un rétrocontrôle négatif par le dihydroptéroate (produit de la réaction), le DHF ainsi que le THF, ce qui suggère que cette enzyme constituerait un point de contrôle de la partie mitochondriale de la voie de biosynthèse du THF (Mouillon et al. 2002). En outre, une isoforme cytosolique de l'HPPK-DHPS a été mise en évidence chez *Arabidopsis* (Storozhenko et al. 2007b). Les auteurs ont démontré que cette copie cytosolique (absente chez d'autres espèces végétales comme la tomate ou le riz) était exclusivement exprimée dans

les tissus reproducteurs (particulièrement dans les graines en développement) contrairement à la forme mitochondriale dont l'expression est constitutive. Les auteurs ont également constaté une accumulation de transcrits correspondant à la forme cytosolique lors d'un stress salin. Malgré ces données, le rôle joué par cette HPPK-DHPS n'est toujours pas clair à ce jour.

La troisième partie de cette voie de biosynthèse correspond à la réaction ATP-dépendante d'attachement d'un résidu glutamate sur le groupement carboxyl du pABA pour former le DHF (étape 9, Figure 3). Cette réaction est catalysée par la dihydrofolate synthétase (Ravanel et al. 2001), une enzyme essentielle au développement de la plante puisqu'une mutation du gène correspondant s'avère embryo-létale chez *Arabidopsis* (Ishikawa et al. 2003).

c. Réduction et polyglutamination

Le DHF est réduit en THF par la dihydrofolate réductase (DHFR) (étape 10, Figure 3). Cette réaction utilise le NADPH comme donneur d'électrons. Chez les plantes supérieures et les protozoaires, l'activité DHFR est portée par une enzyme bifonctionnelle où elle est associée à l'activité thymidylate synthase (TS) (Neuburger et al. 1996) (Rebeille et al. 2006). La partie TS catalyse la méthylation de déoxyuridine-monophosphate (dUMP) en déoxythymidine-monophosphate (thymidylate ou dTMP) en présence de CH₂-THF-Glu_n. La réaction catalysée par la TS est unique car le CH₂-THF-Glu_n agit à la fois comme donneur d'unité C1 et comme agent réducteur, produisant du DHF-Glu_n. Ce dernier est alors réduit à nouveau en THF-Glu_n par l'activité DHFR. Ainsi, le domaine DHFR de l'enzyme bifonctionnelle joue plusieurs rôles. Cette protéine est impliquée dans la réduction du DHF-Glu₁ provenant de la synthèse *de novo* du THF, dans la réduction du DHF-Glu_n produit par l'oxydation spontanée du THF-Glu_n et enfin dans la réduction du DHF-Glu_n produit par l'activité TS. L'association DHFR et TS via un système de "channeling" électrostatique facilite le recyclage du DHF-Glu_n en évitant que ce dernier ne se disperse dans le milieu environnant (Liang et Anderson 1998).

2. Catabolisme et recyclage

Le catabolisme du folate se traduit par une oxydation spontanée des différents dérivés du folate et particulièrement du DHF et du THF. Cette dégradation oxydative conduit au relargage de la partie pABA (sous une forme mono ou polyglutamylée) et du noyau ptérine sous la forme ptérine-aldéhyde (Suh et al. 2001).

Chez les mammifères, le pABA-Glu issu de la dégradation des folates subit une acétylation produisant ainsi de l'acétamidobenzoylglutamate qui est ensuite excrété dans les urines. La partie pterine-aldéhyde est, dans un premier temps, stockée au niveau du foie, puis lentement évacuée *via* le système urinaire.

Lors de différentes études menées chez l'Homme, l'introduction d'acide folique radio-marqué dans un régime alimentaire contrôlé en folates a permis d'évaluer à environ 0,5 % par jour le taux de dégradation du folate (Gregory et Quinlivan 2002). Chez les plantes, il semble que cette vitesse de dégradation soit beaucoup plus importante. En effet, en inhibant par l'emploi de sulfanilamide la synthèse *de novo* de folates sur des plantes cultivées en hydroponie (Orsomando et al. 2006b), il a été estimé que ce catabolisme représente environ 10 % du pool total par jour. Mais contrairement aux mammifères, il semblerait que les plantes soient en mesure de recycler les produits de la dégradation du folate. Bien que cette voie de recyclage ne soit pas encore totalement élucidée, des études menées chez *Arabidopsis* et le pois, complétées par des données recueillies chez certains microorganismes, ont permis à l'équipe de Andrew Hanson de proposer un modèle de recyclage des produits de la dégradation du folate (Hanson et Gregory 2002).

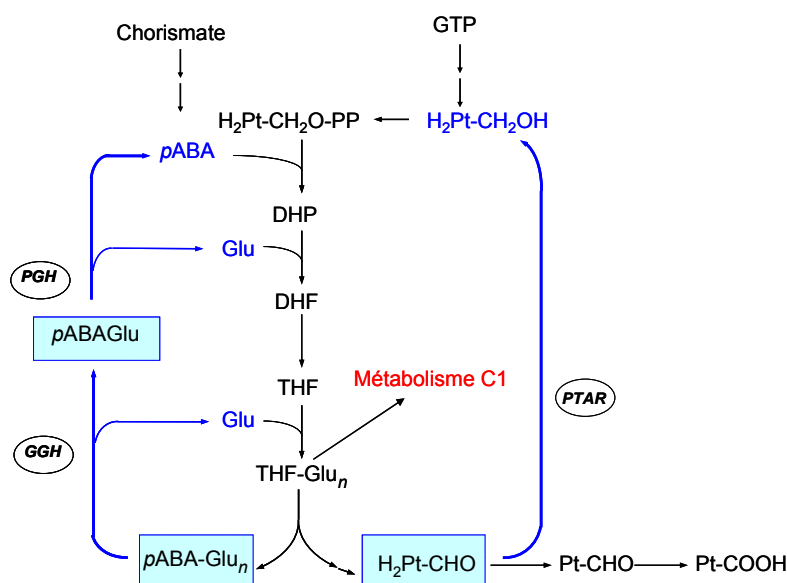


Figure 4 : Schéma illustrant le recyclage du THF, et montrant les deux branches bien distinctes de ce recyclage : d'une part celle du noyau pterine et d'autre part celle de la partie pABA. H₂Pt-CHO dihydropterine-6-aldéhyde ; H₂Pt-CH₂OH hydroxyméthyl-7,8-dihydropterine ; H₂Pt-CH₂O-PP hydroxyméthyl-7,8-dihydropterine pyrophosphate ; Pt-CHO pterine-6-aldéhyde ; Pt-COOH pterine-6-carboxylate ; DHFR dihydrofolate reductase ; GGH *gamma*-glutamyl hydrolase ; PGH *para*-aminobenzoylglutamate hydrolase ; THF-Glu_n tétrahydrofolate polyglutaminé ; DHF-Glu_n dihydrofolate polyglutaminé ; DHF dihydrofolate ; THF tétrahydrofolate ; PTAR pterine aldehyde reductases.

a. Recyclage du pABA-glu

La DHPS étant incapable de manipuler les formes polyglutamylées de pABA, le recyclage du pABA-Glu_n nécessite d'abord l'hydrolyse de la queue polyglutamate grâce à une activité γ -glutamyl hydrolases (GGH), ce qui conduit à la formation de pABA-Glu₁. Chez *Arabidopsis*, trois membres de cette famille ont été identifiés, mais l'activité γ -glutamyl hydrolase n'a été détectée qu'au niveau de la vacuole (Orsomando et al. 2005). Bien que la DHPS puisse utiliser la forme monoglutamylée du pABA, cette réaction reste très largement minoritaire *in vivo* (Orsomando et al. 2006a). La deuxième étape de ce recyclage consiste donc à retirer le dernier résidu glutamate. Cette réaction est catalysée par une *para*-aminobenzoylglutamate hydrolase (PGH). Bien qu'aucun gène codant pour une telle protéine n'ait été identifié, des expériences de localisation subcellulaire pratiquées sur feuilles de pois ont mis en évidence une activité PGH au niveau du cytosol, de la vacuole et, dans une moindre mesure, au niveau des mitochondries (Bozzo et al. 2008).

b. Recyclage du noyau pterine

L'oxydation spontanée du THF conduit dans un premier temps à la formation de dihydroptérine-6-aldéhyde qui peut, elle-même, être oxydée en ptérine-6-aldéhyde (Figure 4). Ces deux molécules peuvent ensuite être réduites respectivement en hydroxyméthyldihydroptérine et hydroxyméthylptérine. Cette dernière subit également une réduction pour former de l'hydroxyméthyldihydroptérine qui est réinjectée dans la voie de biosynthèse du folate (Figure 3). Les enzymes catalysant ces réactions de réduction sont des ptérine aldéhyde réductases (PTAR). L'activité PTAR semble confinée au niveau du cytosol (Noiriel et al. 2007). Récemment un gène codant potentiellement une PTAR a été identifié chez *Arabidopsis*. Le mutant knock-out pour ce gène candidat ne montre pas de phénotype particulier ni de diminution remarquable de l'activité PTAR, ce qui pourrait être expliqué par l'existence de multiples isoformes de cette protéine (Noiriel et al. 2007).

3. Trafic intracellulaire

Si les systèmes de transport du folate sont assez bien connus chez les animaux et notamment chez les mammifères, la situation est tout à fait différente chez les plantes. En effet, jusqu'en 2005, aucun transporteur de folates d'origine végétale n'avait été identifié. Or, si le THF est synthétisé dans la mitochondrie, il participe aux réactions du métabolisme C1

qui ont lieu dans tous les compartiments cellulaires, ce qui suggère un trafic intracellulaire complexe du THF (Figure 3). Egalement, des études *in vivo* ont démontré que les cellules d'*Arabidopsis* ont la faculté de puiser certains folates dans le milieu de culture, ce qui suggère l'existence de système d'influx de folates dans la cellule végétale (Prabhu et al. 1998).

Les deux transporteurs de folate actuellement caractérisés chez les plantes sont localisés au niveau de l'enveloppe plastidiale (Bedhomme et al. 2005) (Klaus et al. 2005). Ces transporteurs appartiennent à des familles différentes et leur fonction a été mise en évidence par des expériences d'expression en systèmes hétérologues (cellules animales, bactéries). Le premier de ces transporteurs (AtFOLT1) (Bedhomme et al. 2005) appartient à la famille des transporteurs mitochondriaux. Cette famille caractérisée par la présence de 6 hélices transmembranaires rassemble des transporteurs qui peuvent être localisés au niveau des mitochondries, mais aussi des péroxysomes et des plastes. Le second transporteur appartient à la famille des transporteurs de folate et de biopérine, famille caractérisée à l'origine chez les protozoaires (Klaus et al. 2005). Les mutants d'*Arabidopsis* pour chacun des deux transporteurs ne présentent pas de phénotype notable dans des conditions standard de culture. De plus, les chloroplastes de ces mutants présentent un statut en folates très proche de celui de chloroplastes de plantules sauvages. La situation semble donc relativement complexe puisque rien qu'au niveau de l'enveloppe du chloroplaste, il existe au moins deux transporteurs de folate.

B. Métabolisme C1

Le terme de métabolisme monocarboné (ou métabolisme C1) désigne l'ensemble des réactions dans la cellule qui nécessitent le transfert d'unités monocarbonées (unités C1).

Les unités C1 impliquées varient en fonction des voies métaboliques (Figure 2) (Cossins et Chen 1997). Ainsi, le 10-CHO-THF est impliqué dans la synthèse des purines et du formyl-méthionyl-ARNt. Le 5-CH₃-THF est le donneur de groupements méthyles pour la synthèse de la méthionine (Cossins et Chen 1997). Le 5,10-CH₂-THF est impliqué dans la synthèse du thymidylate, du pantothénate ainsi que dans la conversion de la sérine en glycine. Le 5-CHO-THF ainsi que le 5,10-CH⁺-THF ne sont pas directement impliqués dans les réactions de transfert d'unités C1 (Goyer et al. 2005). Cependant, ce dernier dérivé fait office de chromophore. En effet, des études, menées entre autres chez *E. coli* et *Arabidopsis*, ont montré que le 5,10-CH⁺-THF peut aussi jouer un rôle d'antenne collectrice de lumière dans

les cryptochromes (récepteurs de la lumière bleue chez les plantes, impliqués dans le contrôle du rythme circadien) (Pokorny et al. 2005) ou dans certaines photolyases, ces dernières enzymes permettant la réparation de l'ADN lorsque celui-ci est dégradé par des rayonnements UV (Malhotra et al. 1995).

1. Origine des unités monocarbonées

Chez les plantes, les trois principaux donneurs de groupements C1 sont la sérine, la glycine et le formate.

a. Sérine et glycine

a1. Sérine

La sérine est la source principale d'unités C1 chez la plupart des organismes (Cossins et Chen 1997). Son carbone 3 est transféré sur les N₅ et N₁₀ du THF-Glu_n pour former du 5,10-CH₂-THF-Glu_n et de la glycine dans une réaction réversible catalysée par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) (Figure 5).

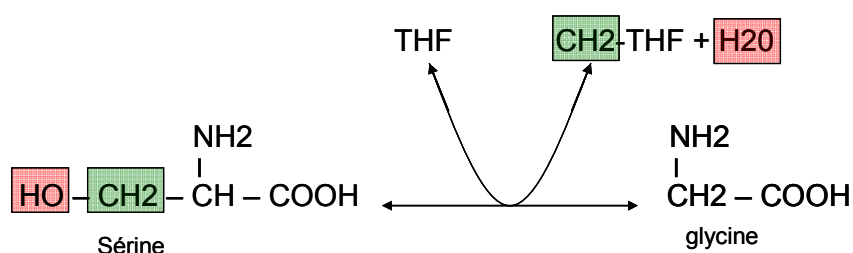


Figure 5 : Conversion sérine–glycine catalysée par la SHMT (sérine hydroxyméthyltransférase).

Chez *Arabidopsis*, 7 gènes ont été annotés comme étant des SHMT potentielles. Parmi celles-ci, deux présentent des séquences d'adressage putatives pour la mitochondrie et deux pour le plaste. Les trois autres SHMT sont dépourvues de séquence d'adressage prédictible et seraient donc potentiellement cytosoliques. La conversion sérine-glycine catalysée par la SHMT est une réaction réversible (Figure 5) dont le sens va dépendre de la distribution des substrats. Ainsi dans la situation "classique", la réaction est largement favorisée dans le sens sérine vers glycine (Besson et al. 1993) (Bauwe et Kolukisaoglu 2003). *A contrario*, dans les mitochondries des tissus foliaires, où le flux de glycine issue de la photorespiration est très important (Douce et Neuburger 1999), l'équilibre entre les deux acides aminés est inversé, favorisant de la sorte la formation de sérine à partir de glycine [Figure 6 (Douce et al. 2001)].

a2. Glycine

L'oxydation de la glycine par la glycine décarboxylase (GDC), complexe multienzymatique présent en abondance dans la matrice mitochondriale des tissus foliaires (Kikuchi et al. 2008) (Douce et al. 2001), conduit également à la formation de 5,10-CH₂-THF (Figure 6). Le complexe GDC est formé de quatre protéines distinctes. La protéine P (protéine contenant un pyridoxal-phosphate) catalyse la décarboxylation de la glycine et le transfert de la partie méthylamine de la glycine sur le bras lipoamide oxydé de la protéine H (H_{ox}). La protéine H chargée avec la méthylamine (H_{met}) interagit ensuite avec la protéine T (protéine liant le THF) pour produire du NH₃ et du 5,10-CH₂-THF. Le bras lipoamide est alors réduit (H_{red}) et doit être oxydé à nouveau pour que le complexe puisse continuer à fonctionner. Cette oxydation est effectuée par la protéine L et conduit à la formation de NADH (Figure 6) (Mouillon et al. 1999).

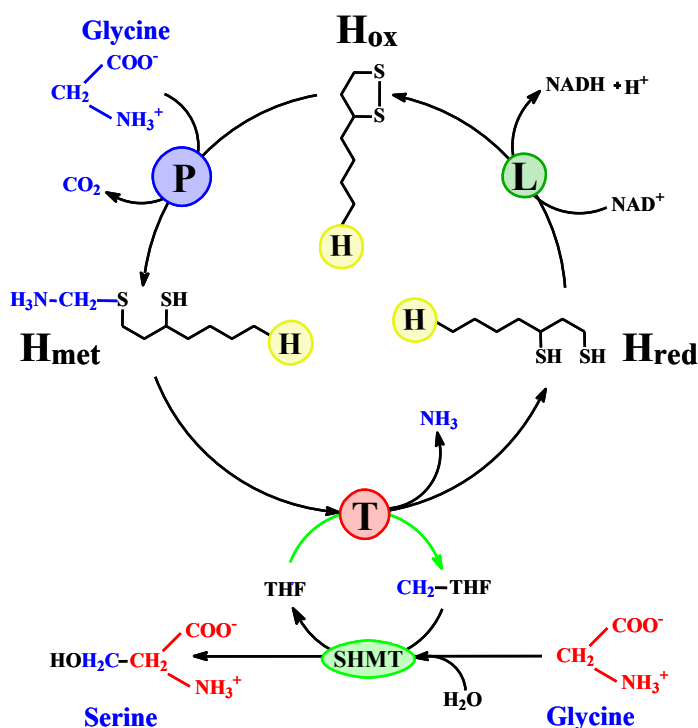


Figure 6 : Réactions catalysées par la glycine décarboxylase et la sérine hydroxyméthyltransférase dans la matrice mitochondriale.

Chez les plantes supérieures, ce complexe représente (en association avec la SHMT) 40% des protéines solubles des mitochondries (Douce et al. 2001). La production de 5,10-CH₂-THF par la GDC ne correspond pas à une production nette d'unités C1. En effet, dans la

mitochondrie, le couplage de la GDC et de la SHMT assure un recyclage quasi immédiat du 5,10-CH₂-THF pour former une molécule de sérine à partir d'une molécule de glycine (Mouillon et al. 1999). Cette molécule de sérine est indispensable au cycle de la photorespiration. Si toutes les molécules de 5,10-CH₂-THF produites par la GDC n'étaient pas recyclées en sérine, on assisterait probablement à un désamorçage du cycle de la photorespiration et par la suite du cycle de Calvin (Bourguignon et al. 1999b).

b. Formate

Le formate est un donneur potentiel de groupements C1 chez les plantes supérieures qui sont capables de le produire à partir de méthanol (Prabhu et al. 1996). La synthèse de 10-CHO-THF à partir du formate et du THF implique l'enzyme ATP-dépendante 10-formyl-tétrahydrofolate synthétase (FTHFS). Chez les levures et les mammifères, la FTHFS est associée avec deux autres activités, la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase et la méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase, pour former une seule protéine trifonctionnelle appelée C1-THF synthase (Song et Rabinowitz 1993). Cette protéine multifonctionnelle est présente chez la levure dans la mitochondrie et le cytosol (Shannon et Rabinowitz 1986). Chez les procaryotes et les plantes supérieures, l'activité FTHFS est portée par une enzyme monofonctionnelle (Nour et Rabinowitz 1992). Dans le génome d'*Arabidopsis*, trois gènes ont été annotés comme FTHFS mais un seul semble contenir tous les domaines nécessaires à la fonction de l'enzyme. Le cytosol, la mitochondrie et le chloroplaste possèdent tous les trois une activité FTHFS (Hanson et al. 2000).

2. Interconversion des unités monocarbonées

Les réactions de conversion entre les dérivés du tétrahydrofolate sont courantes. Celle réalisée entre le 5,10-CH₂-THF, le 5,10-CH⁺-THF et le 10-CHO-THF sont catalysées par une enzyme bifonctionnelle portant les activités 5,10-CH₂-THF déshydrogénase (MTHFD) et 5,10-CH⁺-THF cyclohydrolase (MTHFC) (Figure 7A) (Nour et Rabinowitz 1991). Des études biochimiques réalisées sur des feuilles de pois ont localisé ces activités enzymatiques dans trois compartiments cellulaires : le plaste, la mitochondrie et le cytosol (Neuburger et al. 1996). Ainsi, la colocalisation des activités SHMT, MTHFD et MTHFC permet de subvenir aux besoins de la cellule en dérivés C1 nécessaires à la synthèse des nucléotides, de formyl-méthionyl-tRNA et de pantothénate.

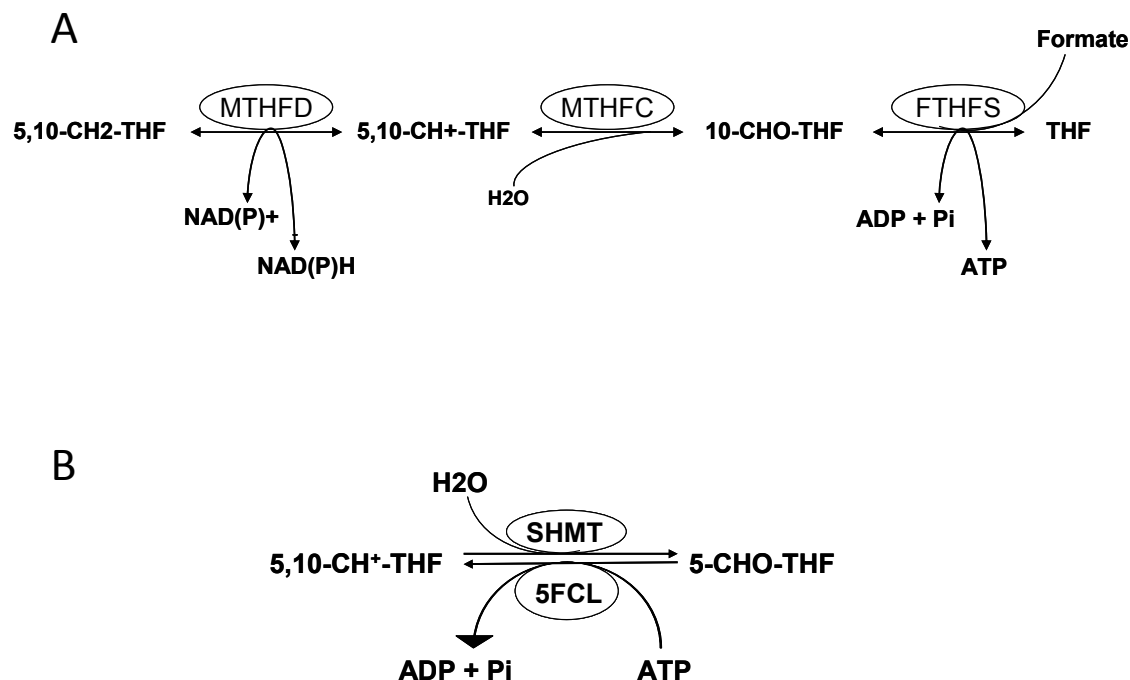


Figure 7 : (7A) Réactions de conversion entre le THF, le 10-CHO-THF, le 5,10-CH⁺-THF et le 5,10-CH₂-THF. FTHFS 10-formyl-tétrahydrofolate synthétase ; MTHFC méthylénététrahydrofolate cyclohydrolase ; MTHFD méthylénététrahydrofolate déshydrogénase. (7B) Réactions de conversion entre le 5,10-CH⁺-THF et le 5-CHO-THF. SHMT: sérine hydroxyméthyltransférase ; 5FCL: 5-formyltétrahydrofolate cycloligase. Regrouper les figures 7 et 8 : 7A et 7B.

Le 5-CHO-THF (ou leucovorine) est formé à partir du 5,10-CH⁺-THF par l'hydrolyse enzymatique de la liaison entre le groupement CH⁺ et le N₁₀ de la partie pABA (Figure 7B). Cette réaction est catalysée par la SHMT; il s'agit là de la deuxième activité catalytique de cette enzyme. Le 5-CHO-THF est le dérivé du THF qui présente la plus grande stabilité. Différents auteurs ont suggéré que ce dérivé métaboliquement inactif est une forme de stockage du folate (Stover et Schirch, 1993), cependant il pourrait aussi avoir un rôle de régulation, peut-être au niveau de la photorespiration (Roje et al, 2002), la SHMT étant inhibée par des concentrations physiologiques de 5-CHO-THF.

La deuxième enzyme qui manipule le 5-CHO-THF est la 5-CHO-THF cycloligase (5-FCL), également appelée 5,10-méthényl-THF synthétase. La 5-FCL réalise la réaction de conversion ATP-dépendante entre le 5-CHO-THF et le 5,10-CH⁺-THF (Figure 7B). Jusqu'à présent, une seule 5-FCL, localisée dans la mitochondrie, a été caractérisée chez *Arabidopsis*. Le rôle de cette enzyme au sein de la mitochondrie est justifié par le fait que le 5-CHO-THF peut représenter jusqu'à 50% du pool mitochondrial de folates (Goyer et al. 2005).

La méthylène-THF réductase (MTHFR) catalyse la réduction du 5,10-CH₂-THF en 5-CH₃-THF. Ce dérivé est impliqué dans la synthèse de méthionine et permet donc, *via* la S-adénosylméthionine (SAM ou AdoMet), d'alimenter les réactions de méthylation cellulaires en groupements CH₃. Chez *Arabidopsis*, les 2 gènes codant pour la MTHFR ne présentent pas de séquence d'adressage, ce qui suggère une localisation cytosolique. Les MTHFR de plantes diffèrent de celles des autres eucaryotes en ceci qu'elles ne sont pas inhibées par la SAM et utilisent le NADH préférentiellement au NADPH (Roje et al. 1999). Cette préférence pour le NADH ainsi que l'insensibilité à la SAM semblent indiquer que le contrôle du flux d'unités C1 vers le 5-CH₃-THF est différent chez les plantes. En effet, la réaction catalysée par la MTHFR chez les mammifères et les levures est, d'un point de vue thermodynamique, très fortement favorisée dans le sens du 5-CH₃-THF. Ainsi l'inhibition de la réaction par la SAM permet d'empêcher un engagement quasi exclusif du 5,10-CH₂-THF vers la synthèse de méthionine, ce qui serait délétère pour les autres réactions du métabolisme C1. Chez les plantes, la réaction catalysée par la MTHFR est réversible, un rétrocontrôle par la SAM n'est alors pas nécessaire pour maintenir le pool de 5,10-CH₂-THF (Roje et al. 1999).

3. Les principales voies métaboliques impliquant le métabolisme C1

Les dérivés du THF sont au cœur du métabolisme C1. Une déficience en folate peut donc impacter tout ou partie de ce métabolisme qui comprend en fait de nombreuses voies de biosynthèse. Lorsque ces cofacteurs deviennent limitant, il peut y avoir compétition entre ces différentes voies pour l'utilisation des dérivés du THF. En effet, il a été montré au laboratoire que lors d'une diminution importante du pool des folates chez la plante, la synthèse de méthionine baisse fortement, alors que la priorité est donnée à la synthèse des nucléotides, qui elle est maintenue (Loizeau et al. 2008). Dans un deuxième temps, le pool de méthionine est restauré grâce au clivage d'une enzyme clé de la biosynthèse de cet acide aminé, la cystathionine γ -synthase (CGS), qui est alors dérégulée (Loizeau et al. 2007). Dans la partie qui suit, nous allons détailler quelques unes des voies métaboliques impliquées dans le métabolisme C1.

a. La synthèse de méthionine

Dans la plupart des situations physiologiques, le flux d'unités C1 le plus important est celui qui alimente la synthèse de méthionine. En effet, outre son incorporation dans les

protéines, cet acide aminé essentiel est également le précurseur de la SAM, molécule qui est le donneur de groupements méthyles dans la quasi totalité des réactions de méthylation qui se déroulent dans la cellule (Figure 8).

Chez les plantes, il existe trois voies de biosynthèse de la méthionine. La première est la voie de synthèse *de novo* à partir de cystéine, d'*O*-phosphohomosérine (OPH) et de 5-CH₃-THF (Figure 8, réactions 1, 2, 3). La seconde voie consiste en un recyclage de la *S*-adénosylhomocystéine suite à l'utilisation de la SAM lors du cycle des méthyles (Figure 8, réactions 6 et 3). Il est intéressant de noter que ces deux voies de synthèse ont une étape commune: la méthylation de l'homocystéine (Hcy) par la méthionine synthase (réaction 3). Cette réaction est folate-dépendante et fait intervenir le 5-CH₃-THF. La troisième voie qui permet la formation de méthionine est spécifique des plantes. Il s'agit du cycle de la *S*-méthylméthionine (SMM) (Figure 8, réactions 7 et 8).

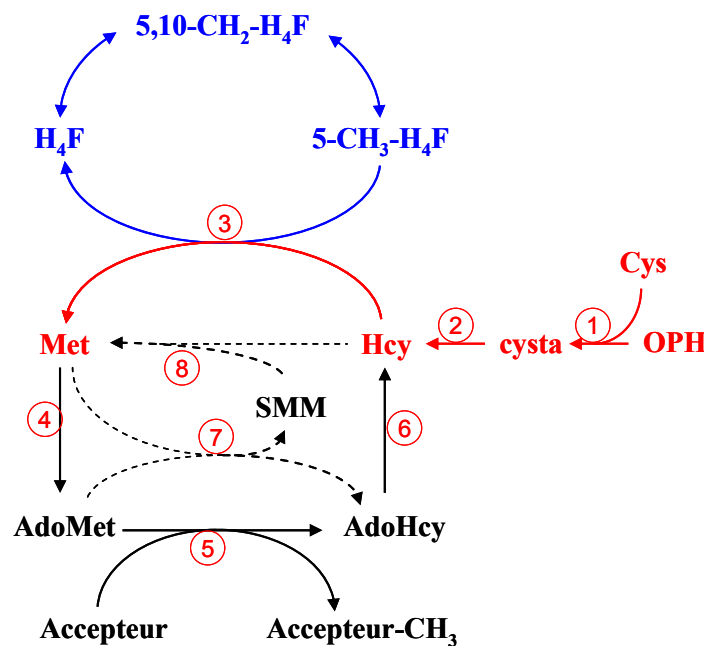


Figure 8 : Biosynthèse de la méthionine et cycle des méthyles. La biosynthèse *de novo* de la méthionine fait intervenir successivement la cystathionine γ -synthase (1), la cystathionine β -lyase (2), et l'isoforme chloroplastique de la méthionine synthase (3). Le cycle des méthylations est réalisé par la SAM synthétase (4), les méthyltransférases dépendantes de la SAM (5), la *S*-adénosylhomocystéine (SAH) hydrolase (6), la méthionine synthase cytosolique (3). Le cycle de la *S*-méthylméthionine (SMM) est constitué de la méthionine *S*-méthyltransférase (7) et de l'homocystéine *S*-méthyltransférase (8). OPH : *O*-phosphohomosérine; Hcy: Homocystéine.

b. Le cycle des méthylations

La SAM est au cœur du métabolisme C1 puisqu'elle est le donneur universel de groupements méthyles au cours des réactions de méthylation. Chez tous les organismes vivants, ces réactions sont impliquées soit dans la synthèse de très nombreux métabolites (choline, chlorophylle etc.), soit dans des processus de régulation comme par exemple ceux impliquant la méthylation des acides nucléiques et des protéines.

Chez les procaryotes, l'ADN peut être méthylé au niveau des résidus adénine de certaines séquences qui sont alors protégées contre les enzymes de restriction. Ces méthylations participent également aux mécanismes de réparation de l'ADN, à sa réplication et à la régulation de l'expression de quelques gènes (Buryanov et Shevchuk 2005).

Chez les eucaryotes, l'ADN peut être méthylé non pas sur les adénines mais sur les résidus cytosine situés généralement au niveau d'îlots CpG. Chez les plantes, ces méthylations se retrouvent généralement au niveau de séquences répétées et de transposons. Lorsqu'elles interviennent au niveau des régions 5' non codantes, elles sont, la plupart du temps, associées à une répression de l'expression du gène correspondant (Saze et al. 2008). Chez les mammifères, les méthylations de l'ADN jouent un rôle très important notamment lors du développement de l'embryon, dans la régulation de l'expression génique et dans l'inactivation du chromosome X. Une altération des méthylations de l'ADN entraîne donc de graves conséquences et est généralement associée au vieillissement de l'organisme et / ou aux premiers stades de l'apparition de cancers (Sulewska et al. 2007).

Outre les méthylations de l'ADN, des régulations épigénétiques peuvent être conduites *via* des modifications covalentes des histones. En effet, les histones peuvent être méthylées, mais également acétylées, phosphorylées ou ubiquitinyllées sur certains résidus, ce qui module l'état de condensation de la chromatine mais n'entraîne pas obligatoirement une répression de l'expression des gènes concernés (Saze et al. 2008).

Il a également été démontré que de nombreuses protéines autres que les histones sont méthylées *in vivo*. Ces méthylations peuvent être portées par des résidus lysine, arginine ou aspartate internes à la séquence protéique mais ces modifications post-traductionnelles peuvent également intervenir au niveau des extrémités N et C-terminales des protéines. Un grand nombre de protéines peuvent être méthylées, mais le rôle de ces méthylations reste encore mal connu. Ces modifications pourraient jouer un rôle dans le contrôle de l'activité ou de la stabilité de certaines protéines, dans le contrôle du trafic cellulaire, lors de la transduction de signaux, dans les mécanismes de réparation de l'ADN et des protéines (Paik

et al. 2007). Les interactions protéine / protéine, ARN / protéine et protéine / membrane lipidique sont également influencées par ces méthylations (Grillo et Colombatto 2005).

Le métabolisme lipidique est lui aussi très largement concerné par les méthylations SAM-dépendantes. En effet, la phosphatidylcholine, qui est le phospholipide majeur des membranes biologiques, est synthétisé à partir de phosphatidyléthanolamine par 3 réactions successives de méthylations (Vance et Walkey 1998).

D'autres réactions de méthylation sont spécifiquement présentes chez les plantes. Par exemple des réactions de méthylation sont nécessaires pour la formation de certains pigments photosynthétiques, comme les chlorophylles (Block et al. 2002) (Van Wilder et al. 2009), pour la synthèse de certains constituants de la paroi comme les pectines (Goubet et al. 1998) et les lignines (Zhong et al. 1998). La biosynthèse des tocophérols (vitamine E) et des plastoquinones fait également intervenir des méthyltransférases SAM-dépendantes (Cheng et al. 2003).

c. La synthèse des nucléotides : AMP, GMP, TMP

La synthèse des nucléotides tient un rôle central au sein du métabolisme de tout organisme. En effet, ils sont à l'origine des éléments structuraux essentiels de l'ADN et de l'ARN, mais intègrent également, pour certains, la structure de nombreux cofacteurs (NAD(P), FAD, SAM et CoA) ainsi que celle de molécules jouant un rôle de signalisation (cAMP). L'AMP et le GMP participent également au métabolisme énergétique de la cellule lorsqu'ils sont phosphorylés (ADP/ATP et GDP/GTP).

c1. AMP et GMP

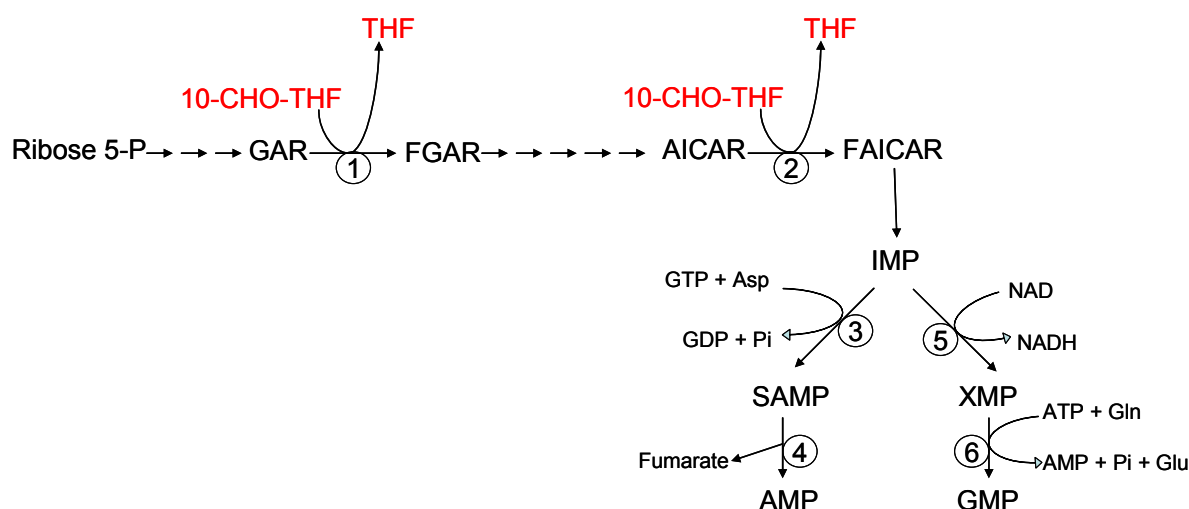


Figure 9 : Synthèse des bases puriques GAR transformylase (1) ; AICAR transformylase (2) ; SAMP synthétase (3) ; Adénosuccinate lyase (13) ; IMP déshydrogénase (5) ; GMP synthase (6) ; Ribose 5-P (ribose 5-phosphate) ; GAR (glycinamide ribonucléotide) ; FGAR (formylglycinamide ribonucléotide) ; AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamide ribonucléotide) ; FAICAR (N-formylaminoimidazol-4-carboxamide ribonucléotide) ; IMP (inosine monophosphate) ; Asp (Aspartate) ; SAMP (Adénylosuccinate) ; XMP (Xanthosine monophosphate) ; Gln (Glutamine) ; Glu (Glutamate).

Les deux bases puriques, l'AMP et le GMP, sont synthétisées chacune en deux étapes à partir d'un même précurseur : l'inosine monophosphate (IMP). La synthèse *de novo* d'IMP à partir du ribose-5-phosphate nécessite 11 étapes dont 2 sont des réactions de formylation nécessitant la participation du 10-CHO-THF (Zrenner et al. 2006). En effet, dans la quatrième étape, la GAR transformylase catalyse la formation de formylglycine ribonucléotide à partir de 10-CHO-THF et de glycinamide ribonucléotide (GAR). Dans la dixième, l'AICAR transformylase catalyse la synthèse de N-formylaminoimidazol-4-carboxamide ribonucléotide à partir de l'aminimidazol-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) et du 10-CHO-THF (Figure 9).

Chez les animaux et les champignons, la synthèse *de novo* de purine se déroule dans le cytosol. Chez les plantes, la situation semble différente. En effet, l'analyse des séquences protéiques des enzymes impliquées dans cette synthèse *de novo* indique que la formation d'IMP ainsi que celle d'AMP se déroule dans les plastides alors que la synthèse de GMP a lieu dans le cytosol. Les deux étapes folates-dépendantes de cette synthèse sont donc plastidiales.

c2. Thymidilate

Le thymidylate joue un rôle essentiel puisqu'il intervient dans la composition de l'ADN. C'est pourquoi l'enzyme qui catalyse sa formation, la thymidylate synthase (TS) est la cible de certains agents anticancéreux (le 5-fluorouracil par exemple). La TS réalise la dernière étape de la synthèse *de novo* du thymidylate : la méthylation du dUMP en dTMP. Lors de cette réaction, le 5,10-CH₂-THF, qui tient lieu de cofacteur à la TS, subit, en plus de sa déméthylation, une réduction qui le fait passer sous la forme DHF. Ainsi, pour maintenir la synthèse d'ADN, la cellule doit absolument réduire à nouveau la molécule de DHF en THF, action réalisée par la DHFR. Chez la plupart des organismes, la TS et la DHFR sont des enzymes monofonctionnelles alors que chez les plantes les deux activités sont rassemblées sur une enzyme bifonctionnelle, la DHFR-TS, dont il existe chez les plantes plusieurs isoformes localisées dans différents compartiments. Cela suggère une distribution multi-compartimentée de la synthèse *de novo* de thymidylate alors que chez les animaux elle est exclusivement cytosolique (Appling 1991) (Sahr et al. 2005).

II. Biosynthèse du THF : les applications

Le THF et ses dérivés sont essentiels chez tous les organismes vivants. Ils sont synthétisés *de novo* chez la plupart des microorganismes et chez les végétaux. Par contre, les mammifères ne possèdent pas la totalité des enzymes nécessaires à la synthèse du THF, il est donc apporté par l'alimentation, et en particulier l'alimentation d'origine végétale. En effet, toutes les étapes conduisant à la synthèse du DHF sont absentes chez l'animal, qui peut par contre, le réduire et réaliser sa polyglutamylation grâce à la présence d'une DHFR et d'une FPGS. Cette auxotrophie vis-à-vis du folate peut, dans des situations de malnutrition, aboutir à l'apparition de carence. Deux aspects appliqués émergent de ces observations. Le premier concerne la nutrition et la manipulation de la voie de biosynthèse (surtout chez les plantes) afin de proposer une alimentation plus riche en folates. Le deuxième aspect vise, au contraire, à spécifiquement inhiber cette biosynthèse chez les microorganismes pathogènes pour l'homme.

A. Conséquences d'une carence en folate chez l'homme

Les insuffisances en folates, le plus souvent d'origine alimentaire, peuvent également avoir pour origine une anomalie génétique touchant un gène impliqué dans l'absorption ou

bien dans le métabolisme de ce cofacteur. Quelles qu'en soient les causes, les déficiences en folate sont à l'origine de graves maladies.

Anomalies de la division cellulaire

Une des manifestations cliniques liées à une forte carence en folates est l'apparition d'une anémie dite mégaloblastique. En effet, une carence en folates entraîne un défaut de la synthèse des acides nucléiques, ce qui a pour conséquence de bloquer le cycle cellulaire, provoquant des anomalies de la division. Ce phénomène touche particulièrement les tissus présentant une forte division cellulaire et principalement les érythrocytes : les globules rouges sont moins nombreux mais présentent une taille supérieure à la normale, d'où le qualificatif "mégaloblastique" (Aslinia et al. 2006).

La perturbation de la division cellulaire peut également se traduire chez la femme enceinte par une anomalie de fermeture du tube neural (AFTN) du fœtus au cours de l'embryogenèse. Les AFTN correspondent à un défaut de fermeture, avant la 4ème semaine de grossesse, de la partie postérieure des vertèbres entourant le système nerveux central entraînant de graves malformations parmi lesquelles certaines formes de *spina bifida*, d'anencéphalie et d'encéphalocèle. La surveillance des anomalies congénitales en Europe, pour la période 1980-1999, montre que l'incidence des AFTN est de 10,9 / 10 000 naissances, le *spina bifida* étant la plus répandue (5,4 / 10 000 naissances). Différentes études épidémiologiques ont montré qu'une complémentation de l'alimentation maternelle en acide folique lors de la période périconceptionnelle (4 semaines avant conception et 8 semaines après) réduit de 40 à 75% le risque d'une première manifestation d'AFTN, mais également le risque de récurrence.

Augmentation des risques de cancers

Depuis plusieurs années, de nombreuses études mettent en relation le statut en folate et l'apparition de nombreux types de cancers (col de l'utérus, colorectal, poumon, oesophage, cerveau, pancréas, sein ...). Les études les plus complètes à ce sujet concernent néanmoins l'incidence des cancers colorectaux en fonction de l'apport en folates (Choi et Mason 2002). Il a ainsi été démontré que plusieurs aspects du métabolisme C1 sont impliqués dans l'aggravation des risques de développer un cancer (Hubner et Houlston 2009). Le rôle que joue le folate dans la synthèse des nucléotides en est un. Un déficit en cas de carence en thymidylate induit une incorporation erronée d'uracile lors de la synthèse d'ADN. Les mécanismes de réparation de l'ADN n'étant pas totalement fiables, une carence en folates augmente la fréquence des mutations de l'ADN et aggrave donc le risque d'apparition de cancers (McKinnon et Caldecott 2007). Une carence en folates induit également une

diminution de la synthèse de méthionine et donc de *S*-adénosylméthionine, ce qui a pour conséquence de diminuer la disponibilité en groupements méthyles dans la cellule. Or, les perturbations des méthylations de l'ADN sont également des facteurs aggravant les risques de cancers. Une réduction globale des méthylations de l'ADN peut se traduire par une instabilité chromosomique et par une augmentation des événements de mutations (Eden et al. 2003).

Augmentation des risques cardiovasculaires

Une carence en folates provoque également une accumulation du précurseur de la méthionine : l'homocystéine. Cette hyperhomocystéinémie est à l'origine de nombreuses maladies. Plusieurs mécanismes pathologiques de l'hyperhomocystéinémie ont été proposés, notamment une oxydation de l'endothélium (Cengel et Sahinarslan 2006). Ce stress oxydant favorise également la peroxydation de lipides ce qui se traduit par une réponse inflammatoire, accélérant le phénomène d'athérosclérose. Sont également mis en cause : une induction de l'activation et de l'agrégation des plaquettes, une altération de l'équilibre entre agents procoagulants et anticoagulants, une diminution des méthylations ainsi qu'une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, tous ces désordres ayant pour conséquence une augmentation des risques cardiovasculaires (infarctus du myocarde, embolie pulmonaire...) (Trabetti 2008) (Li et al. 2009).

Augmentation des risques de maladies neurodégénératives

Plus récemment, des rapports relient déficience en folate, hyperhomocystéinémie et maladies neurodégénératives, notamment les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Mattson 2003). Une carence en folate entraîne une diminution de la synthèse de *S*-adénosylméthionine et donc une réduction de la concentration de cette molécule dans le fluide cérébrospinal ainsi qu'une hyperhomocystéinémie. Cet appauvrissement a pour conséquence de diminuer les réactions de méthylation, provoquant de la sorte une baisse de la synthèse de myéline, substance qui gaine et protège les nerfs. De plus, il a été observé que des individus atteints de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie de Parkinson présentaient les mêmes lésions du système vasculaire cérébral que chez des rats ayant développé une hyperhomocystéinémie suite à un régime pauvre en folates (Tchantchou et Shea 2008).

De nos jours, la déficience en folate est une des carences vitaminiques les plus fréquentes dans le monde et pose un problème de santé publique aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés. Les apports journaliers en folates recommandés par l'Académie Nationale des Sciences américaine sont de 400 µg / jour pour

l'ensemble de la population (hormis les femmes enceintes et allaitantes pour lesquelles les recommandations sont respectivement de 600 µg / jour et 500 µg/ jour).

Une supplémentation alimentaire en folates, semble difficile à mettre en place notamment dans les pays en voie de développement. Les végétaux représentant la source alimentaire principale de folates, une stratégie alternative à cette supplémentation consisterait à obtenir ou à sélectionner des plantes capables d'accumuler ces composés. Ainsi, différentes études pilotes ont consisté à manipuler, chez différentes espèces végétales, la voie de synthèse du folate afin d'accroître leur teneur en vitamine B9. Ces essais d'ingénierie métabolique ont été menés notamment chez le riz et la tomate, deux espèces végétales dont l'intérêt alimentaire est indéniable, mais pauvres en folates (Storozhenko et al. 2007b) (Diaz De La Garza et al. 2007). En effet, les céréales et notamment le riz, constituent l'alimentation de base de millions de personnes à travers le monde. La tomate est un des fruits les plus consommé dans les pays industrialisés et présente l'avantage d'être souvent consommée crue, ce qui permet d'éviter la dégradation de la vitamine B9 lors de la cuisson. La manipulation génétique de la tomate a permis d'augmenter la teneur en folates du fruit mûr de plus de 25 fois et cette teneur a été augmentée jusqu'à 100 fois chez le riz (Storozhenko et al. 2007b) (Diaz De La Garza et al. 2007). Ces résultats ont été obtenus grâce à la surexpression simultanée de deux enzymes, la GTP cyclohydrolase et l'ADC synthase, montrant ainsi que l'ensemble de la voie de biosynthèse est limitée par ces deux étapes.

B. Comparaison des voies de biosynthèse du THF chez diverses espèces modèles

Lorsque l'on compare la voie de biosynthèse du folate chez différents organismes modèles, on constate que l'organisation est globalement la même (figure 10). Cependant, des différences existent, notamment en ce qui concerne l'organisation des enzymes. En effet, chez la plupart des bactéries les étapes sont réalisées par des enzymes monofonctionnelles alors que chez les plantes et les apicomplexes, et d'une manière générale chez les eucaryotes, certaines étapes sont réalisées par des enzymes multifonctionnelles.

Ainsi la transformation du chorismate en ADC est catalysée par deux enzymes chez les bactéries, PabA et PabB (Huang et Gibson 1970), alors que chez les plantes, les levures et les apicomplexes on assiste à une fusion de ces enzymes pour donner une protéine bifonctionnelle : la GAT-ADCS (figure 10 étape 5) (Basset et al. 2004d). Le même

phénomène est observable au niveau des réactions catalysant l'association du pABA et du noyau pterin (figure 10 étapes 7 et 8).

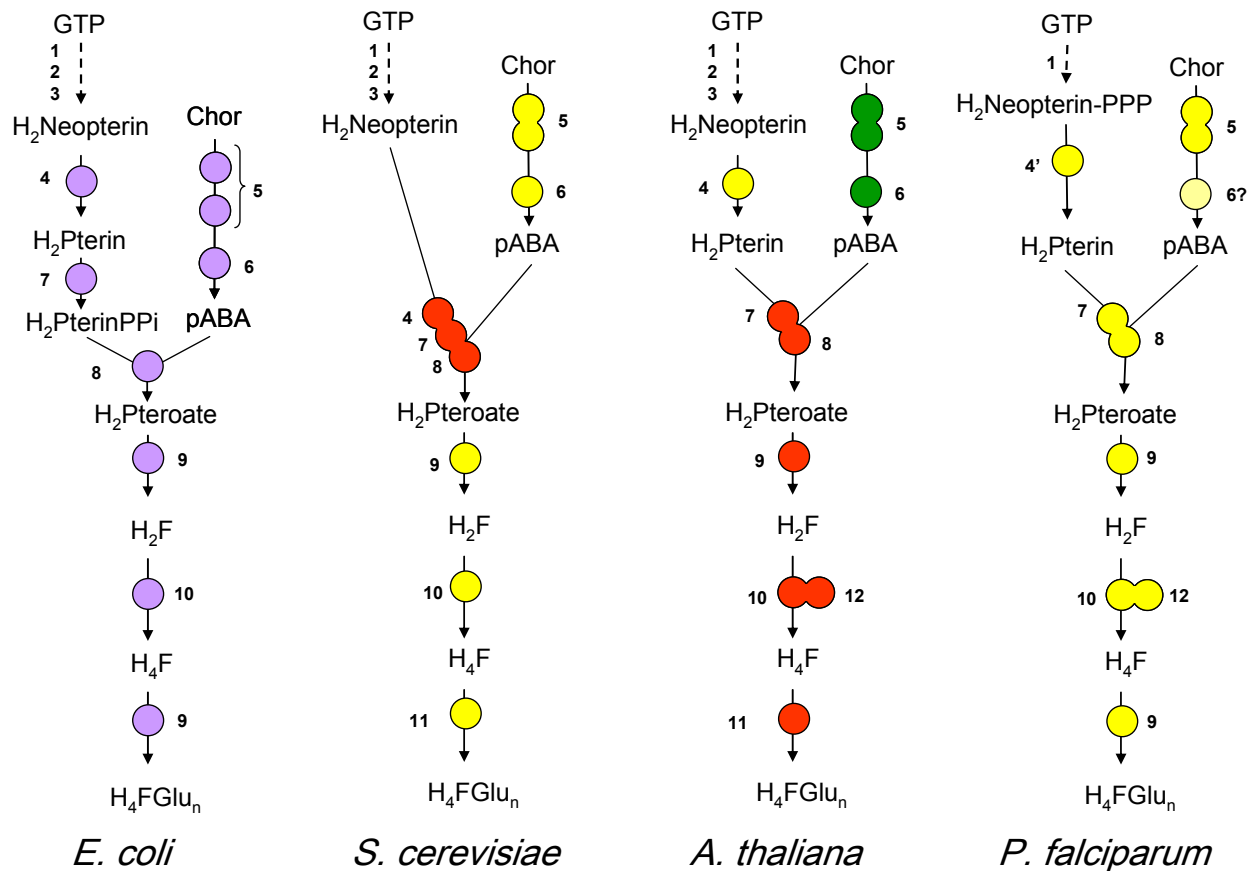


Figure 10 : Représentation schématique de la biosynthèse de H₄FGlu_n chez différents organismes. (1) GTP cyclohydrolase I, (2) NUDIX hydrolase, (3) unspecific phosphatase, (4) dihydroneopterin aldolase, (4') pyruvoyltetrahydropterin synthase, (5) aminodeoxychorismate synthase (PabA et PabB chez *E. coli*), (6) aminodeoxychorismate lyase, (7) hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase, (8) dihydropteroate synthase, (9) dihydrofolate synthetase, (10) dihydrofolate reductase, (11) folylpolyglutamate synthetase, (12) thymidylate synthase. Les étapes 4 à 9 sont absentes chez l'animal. Les enzymes en jaunes sont présentes dans le cytosol, en vert, dans le chloroplaste, en rouge, dans la mitochondrie. Il s'agit d'une localisation encore prédictive chez la levure et Plasmodium. Chez Plasmodium, l'enzyme 6 n'est pas encore identifiée.

En effet, les activités impliquées sont portées par deux enzymes distinctes chez les bactéries, la 6-hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase (HPPK) et la dihydropteroate synthase (DHPS) (Talarico et al. 1991), alors que ces deux protéines sont fusionnées chez les végétaux (Mouillon et al. 2002) et les parasites du type apicomplexe (Hyde 2005). Chez les levures, il s'agit même d'une enzyme trifonctionnelle qui porte aussi l'activité dihydroneoptérine aldolase. Enfin, la dihydrofolate reductase (DHFR) est aussi une enzyme bifonctionnelle, associée à la thymidylate synthase (TS), chez les plantes et les apicomplexes alors que DHFR et TS sont séparées chez les procaryotes, la levure et l'animal (Neuburger et

al. 1996). Il est d'ailleurs intéressant de mentionner à ce propos que la DHFR est peut-être un marqueur de l'évolution. En effet, un trait commun aux organismes bicontes (organismes issus d'une cellule eucaryote possédant deux flagelles tels que plantes, algues, euglènes et apicomplexes) est la fusion des gènes TS et DHFR, ce qui n'est pas le cas chez les organismes unicontes (organismes unicellulaires à un seul flagelle, à l'origine des animaux, des champignons, des métazoaires, des amibes etc.) (Cavalier-Smith 2003).

L'analyse succincte présentée sur la figure 10 suggère que l'organisation de la voie de biosynthèse du folate chez les plantes est plus proche de celle des apicomplexes que des autres organismes eucaryotes comme la levure. Cette ressemblance est peut-être liée à l'origine commune qui existe entre ces deux types d'organismes (voir le chapitre suivant). De ce point de vue, il est possible que la voie de biosynthèse des plantes puisse servir de modèle pour mieux comprendre comment le métabolisme du folate, et plus généralement le métabolisme C1, est régulée chez des parasites comme *Toxoplasma* ou *Plasmodium*. En effet, la voie de biosynthèse du folate est une cible thérapeutique de choix pour lutter contre un certain nombre de maladies parasitaires ou d'infections bactériennes. L'identification de nouvelles molécules actives contre des enzymes de plantes pourraient alors aussi présenter un intérêt dans la lutte contre les maladies infectieuses comme la toxoplasmose ou la malaria.

C. La filiation plantes-apicomplexes

1. Définition des apicomplexes

Depuis une décennie, le *phylum* des *Apicomplexa* auquel appartiennent *P. falciparum* et *T. gondii* a suscité un intérêt renouvelé car l'augmentation des données moléculaires et cellulaires ont permis de progresser dans la compréhension de ces organismes, de l'évolution de leurs génomes (nucléaire, mitochondrial et plastidial) et de leur place dans l'évolution.

Le botaniste canadien Thomas Cavalier-Smith propose une classification qui tente de concilier les données de phylogénie moléculaire et les scénarios d'endosymbiose (Cavalier-Smith 1998) qu'il a récemment décrit dans un « arbre de la vie », (Cavalier-Smith 2004). Deux schémas d'organisation des cellules eucaryotes seraient apparus, d'une part les Bicontes (auxquels appartiennent les plantes et les apicomplexes) avec un cône de microtubules simples attaché à un unique centriole, et les Unicontes (auxquels appartiennent les animaux et les champignons) avec deux centrioles.

Alastair Simpson et Andrew Roger (Simpson et Roger 2004) ont proposé une représentation de ce qu'ils appellent les "vrais règnes des eukaryotes", obtenue en privilégiant

les données moléculaires, en particulier des fusions de gènes marqueurs phylogénétiques. Cette classification se présente sous la forme d'un arbre séparant six groupes majeurs, *Opisthokonta*, *Amoebozoa*, *Plantae*, *Excavata*, *Rhizaria* et *Chromalveolata* (groupe dans lequel se situent les *Apicomplexa*) (Figure 11).

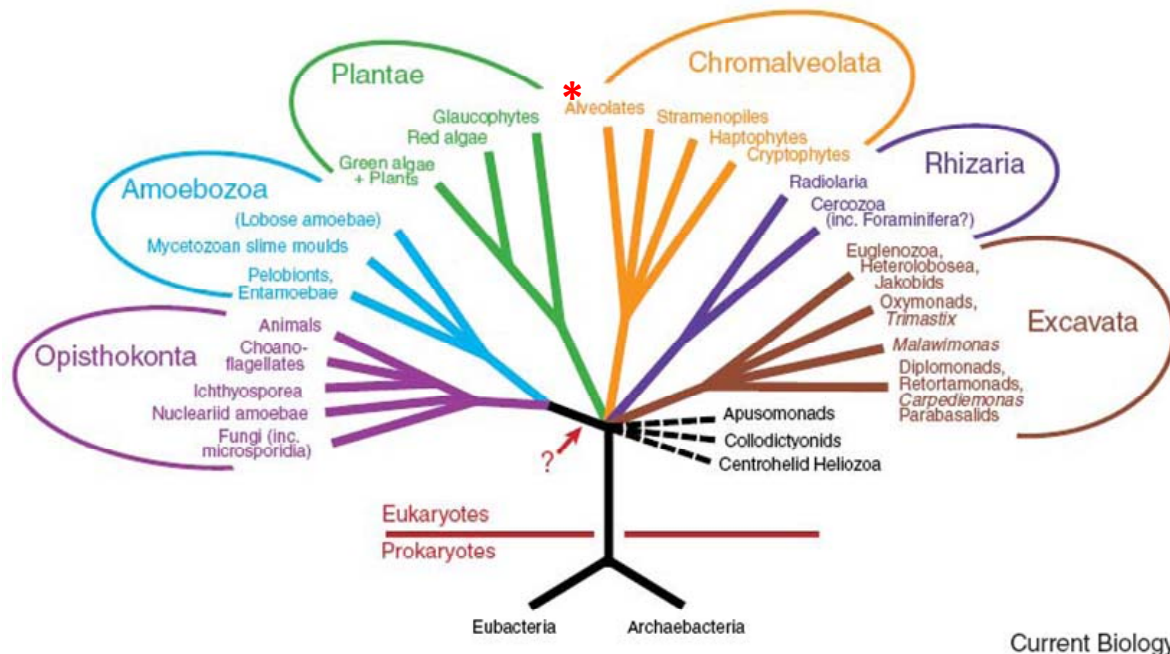


Figure 11 : Les "vrais" règnes des Eucaryotes selon Simpson et Roger (2004). Ce schéma privilégie les informations moléculaires obtenues à partir d'un ensemble de séquences considérées comme des marqueurs phylogénétiques. La flèche indique la position possible de la racine, fondée sur l'analyse de fusion de gènes marqueurs. Le signe (*) indique le groupe dans lequel les Apicomplexes sont classés (dans le groupe des Alvéolés).

Selon la classification proposée par Simpson et Roger, *T. gondii* et *P. falciparum* sont donc des protistes, des *Chromoalveolata* et plus particulièrement, des Alveolates, sous-groupe dans lequel sont classés les *Apicomplexa*. Dans les deux types de classification on constate que le groupe des *plantae* (plantes) est proche de celui des *Chromoalveolata* et donc des apicomplexes.

2. La théorie de l'endosymbiose

Une des caractéristiques des Apicomplexes, à l'exception notable des cryptosporidies, est l'existence d'un plaste vestigial non photosynthétique, l'apicoplaste. Cet organite qui possède un génome circulaire de 35 kb, a été initialement décrit par ses caractéristiques morphologiques, à savoir la présence de quatre membranes délimitantes (Siddall 1992). Dans la fin des années 1990, deux groupes ont finalement donné la preuve de l'origine végétale de

l'apicoplaste par hybridation *in situ* de sondes ARN et ADN et par des analyses de phylogénie moléculaire (McFadden et al. 1996) (Kohler et al. 1997). Des études de mutants de division montrent que l'apicoplaste est indispensable à la survie du parasite, (Fichera et Roos 1997) (He et al. 2001).

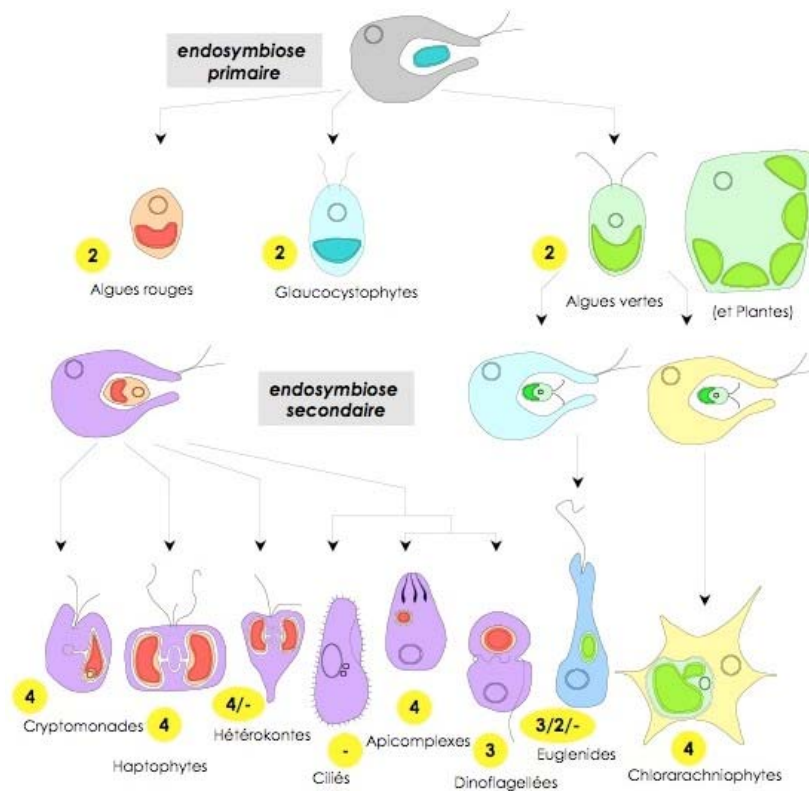


Figure 12 : Origine de grands phylums de protistes suivant l'hypothèse des endosymbioses secondaires.

x = nombre de membranes entourant le plaste. Une endosymbiose primaire entre un eucaryote inconnu (gris) et une cyanobactérie a donné les trois premières lignées de cellules à plaste : algue rouge, glaucocystophyte et algue verte. Deux endosymbioses secondaires différentes de l'algue verte vont donner la lignée des Eublenides (bleu) et des Chlorarachniophytes (jaune). Une endosymbiose secondaire entre un eucaryote et l'algue rouge a donné la famille des Chromalveolata dont fait partie les apicomplexes (violet) (Archibald et Keeling 2002).

L'endosymbiose primaire entre une cyanobactérie et une cellule eucaryote a donné naissance aux deux membranes plastidiales des plantes supérieures, des algues vertes, des algues bleues et des algues rouges. L'endosymbiose secondaire a pour conséquence, la formation et la conservation de membranes supplémentaires : les plastes complexes issus de ce type d'évolution possèdent donc trois ou quatre membranes. L'apicoplaste est issu de l'endosymbiose secondaire d'une algue, probablement de la lignée rouge (Figure12) (Walter et McFadden 2005). Il existe donc une origine commune entre les plantes et les apicomplexes.

3. Extrapolation du modèle plante vers les apicomplexes

Cette origine commune entre les plantes et les apicomplexes peut être exploitée non seulement pour mieux comprendre la physiologie des apicomplexes, mais aussi pour trouver de nouveaux moyens de lutte contre les pathologies associées à ces microorganismes. Un bel exemple est celui étudié au laboratoire et concernant une enzyme du chloroplaste, la monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) synthase. En effet, les membranes des plastes ne contiennent pas ou peu de phospholipides, lipides constitutifs de la plupart des membranes des organismes vivant, mais des galactolipides, une autre famille de glycérolipides dont la tête polaire est constituée de galactose. La synthèse de ces lipides fait intervenir, entre autres, la MGDG synthase (Marechal et al. 2000). Les parasites du phylum des apicomplexes contiennent aussi des lipides du type ‘galactolipides’ (Botte et al. 2008), et il a été montré qu’un inhibiteur spécifique de cette enzyme avait des propriétés non seulement herbicides mais aussi antiparasitaire (thèse Cyrille Botte, 2007).

Bien que la compartimentation de la voie de biosynthèse du folate ne semble pas semblable chez les plantes et les apicomplexes, la ressemblance qui existe entre ces deux organismes pour certaines enzymes de la voie pourrait être utilisée pour extrapoler le modèle plante vers le modèle parasite. En effet, les molécules de type ‘antifolate’ sont connues depuis longtemps pour être des antiparasitaires efficaces (voir ci-dessous). La bonne connaissance du métabolisme du folate acquise chez les plantes, la facilité de manipulation de ces organismes tant pour la mise en œuvre de leur culture que pour tester de potentiels inhibiteurs devraient permettre de gagner un temps précieux dans la phase initiale de recherche de nouvelles molécules antifolate, molécules qui, une fois démontrées leurs propriétés herbicides, pourront être ensuite testées sur les parasites eux-mêmes.

D. La voie de biosynthèse du THF : une cible antibiotique, herbicide et antiparasitaire

Comme nous l’avons décrit précédemment, les voies métaboliques dans lesquelles sont impliqués les différents dérivés du THF sont essentielles. L’absence de ces cofacteurs entraîne un arrêt de la division et, éventuellement, la mort cellulaire. Puisque les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du folate sont absentes chez l’homme, elles représentent donc des cibles antibiotiques, herbicides et antiparasitaires potentielles. Cette propriété a été exploitée depuis longtemps et de nombreux médicaments à propriétés antibiotiques et antiparasitaires

sont basés sur une inhibition de la voie de biosynthèse du folate. Aujourd'hui encore, si l'utilisation des antifolates comme antibiotiques est plus marginale, leur emploi comme antiparasitaires reste primordial. En général, ces molécules sont efficaces à la fois sur la malaria (*Plasmodium*) et la toxoplasmose (*Toxoplasma*), deux infections que nous allons décrire brièvement.

1. La toxoplasmose et le paludisme : deux maladies causées par des parasites du phylum apicomplexe

a. La toxoplasmose

La toxoplasmose est une infection parasitaire dont l'agent est le protozoaire *T. gondii*. Le parasite infecte le plus souvent des animaux à sang chaud, y compris l'être humain, mais son hôte définitif est un félin (dont le chat fait partie) (Torda 2001). Bénigne, voire asymptomatique dans l'immense majorité des cas pour les sujets immunocompétents, elle ne présente de risque sérieux que pour les femmes enceintes séronégatives et les sujets ayant un système de défense immunitaire affaibli (Montoya et Liesenfeld 2004). La maladie est présente partout dans le monde et on estime qu'un tiers de la population mondiale est infectée par *T. gondii*. Sa prévalence chez l'être humain est variable. Pour les adultes présentant une séropositivité au Toxoplasme (et donc une immunité à une réinfection), la prévalence est faible en Asie ou en Amérique, elle est inférieure à 30 % dans les pays scandinaves et dans le Royaume-Uni, elle est de 20 à 50 % en Europe du sud ainsi que dans les régions humides de l'Afrique et de 50 à 70 % en Europe de l'ouest (80 % en France). La toxoplasmose est transmise par la mère à son fœtus. En France en 2003, la séroprévalence chez la femme enceinte était près de 44 %. Le risque que le fœtus soit atteint, et la gravité de l'infection, dépend du stade de la grossesse. Le risque est inférieur à 2 % avant deux mois de grossesse mais dans ce cas l'atteinte fœtale est grave. Il atteint 70 % en fin de grossesse et le fœtus subira alors essentiellement des lésions oculaires (Berger 2003).

b. Le paludisme

Le paludisme affecte les êtres humains depuis plus de 50 000 ans et serait pathogène pour l'espèce humaine depuis le début de son histoire (Joy et al. 2003). Le paludisme (du latin *paludis*, « marais »), aussi appelé malaria (de l'italien *mal'aria*, « mauvais air »), est une maladie infectieuse due à un parasite du genre *Plasmodium*. Avec plusieurs centaines de

millions de personnes malades chaque année et entre un et trois millions de décès par an, le paludisme demeure la parasitose la plus importante et concerne majoritairement les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes. 80 % des cas sont enregistrés en Afrique subsaharienne bien que la majorité des pays en voie de développement soit touchée.

Le parasite du paludisme est transmis lors de la piqûre par une femelle moustique du genre *Anopheles*, elle-même contaminée après avoir piqué un animal homéotherme impaludé. Le parasite envahit les cellules hépatiques de la victime puis circule dans le sang, en colonisant les hématies et en les détruisant. Cinq espèces de *Plasmodium* sont impliquées en pathologie humaine. La forme la plus grave du paludisme est causée par *P. falciparum*, responsable d'une grande majorité des décès. *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* provoquent des formes de paludisme « bénignes » qui ne sont généralement pas mortelles (Cox 2002).

2. Les enzymes ciblées et les molécules efficaces

Les inhibiteurs de la synthèse des folates (ou antifolates) sont couramment utilisés en médecine depuis une soixantaine d'années. En effet, de nombreux organismes pathogènes pour l'Homme sont autotrophes pour le folate, et certains antifolates sont employés avec succès pour leurs propriétés antiparasitaires (notamment comme antipaludéen) (Nzila 2006b).

A l'heure actuelle, seulement deux enzymes de la voie de biosynthèse du folate sont ciblées : il s'agit de la dihydroptéroate synthase (DHPS) qui intervient lors de l'assemblage du noyau pterin et du pABA, et de la dihydrofolate reductase (DHFR) qui transforme le dihydrofolate en tétrahydrofolate.

a. Inhibiteurs de la dihydroptéroate synthase

Les sulfamides sont des molécules de synthèse, construites sur l'observation de l'activité antibiotique du prontosil. Les sulfamides sont des antibiotiques contenant du soufre. Ils sont composés d'un groupement amine lié à un benzène aromatique qui, lui-même, est lié à un groupement $-\text{SO}_2\text{NH}-\mathbf{R}$ en position para (figure 13). La forme la plus basique des sulfamides est la sulfanilamide dans lequel la chaîne rattachée \mathbf{R} est un atome d'hydrogène (figure 13). Cette chaîne permet de modifier certaines propriétés physiques telles que la solubilité du produit et son mode de transport dans l'organisme humain. Les sulfamides sont des analogues du pABA, dont ils prennent la place au niveau du site catalytique de la DHPS. Ce sont donc des inhibiteurs compétitifs du pABA. Leurs efficacités et leurs utilisations

varient en fonction de la molécule. En tant qu'antibiotiques, ils peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres molécules dans des infections cutanées, intestinales ou urinaires. En tant qu'antiparasitaires, ces molécules sont relativement peu efficaces lorsqu'utilisées seules (voir Tableau 1). Par contre, leurs efficacités augmentent considérablement lorsqu'elles sont associées à d'autres molécules, en particulier des inhibiteurs de la DHFR. En effet, ces molécules agissent de façon synergique sur la voie de biosynthèse du folate. L'inhibition de la DHPS par les sulfamides diminue la quantité de dihydroptéroate et donc de dihydrofolate disponible pour l'activité de la DHFR. La diminution concomitante du substrat et de l'activité de la DHFR permet à la combinaison de ces deux drogues d'être redoutablement efficace.

Table1 : Inhibition de la DHPS de *P. falciparum* par six sulfamides différents (Zhang et Meshnick 1991). IC₅₀ (concentration en drogue qui bloque 50% de la prolifération des parasites), *K_i* (constante d'inhibition sur la DHPS ; mesure la constante d'équilibre entre l'enzyme et l'inhibiteur ; indique la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés).

Droque	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
Dapsone	33	6 ± 2
Sulfamoxole	55	7 ± 3
Sulfamethoxazole	100	36 ± 19
Sulfaquinoxaline	40	15 ± 3
Sulfadiazine	500	89 ± 18
Sulfadoxine	400	39 ± 24

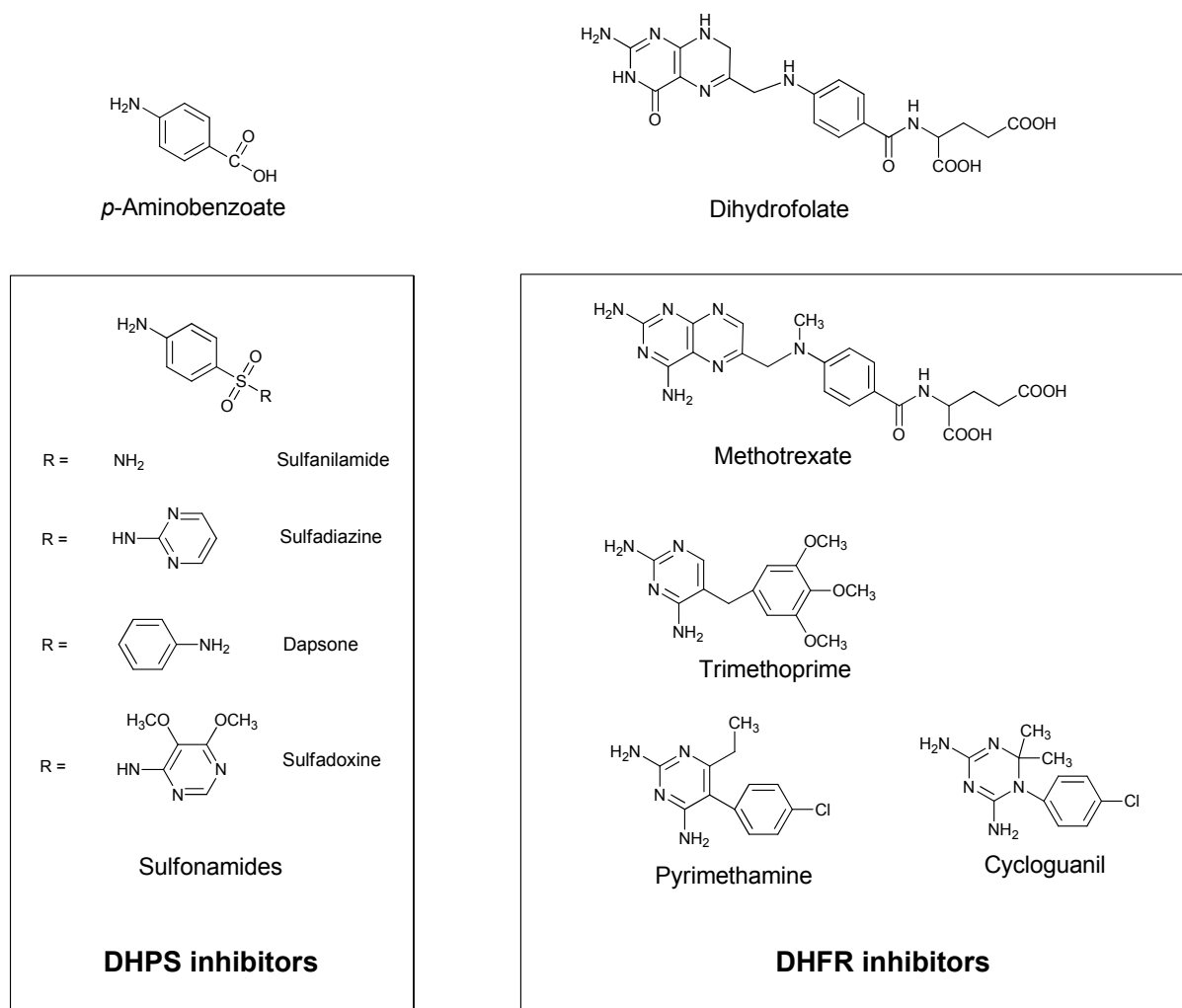


Figure 13 : Structures chimiques des substrats et de quelques inhibiteurs de la DHPS et de la DHFR

b. Inhibiteurs de la dihydrofolate reductase

La dihydrofolate réductase, DHFR, contrairement à la DHPS, est présente chez tous les organismes vivants, y compris l'animal. Son rôle est de recycler le DHF produit lors de la synthèse du thymidylate (voir plus haut). Cette fonction est essentielle dans toutes cellules en division, faute de quoi la synthèse du thymidylate devient limitante. Pour cette raison, cette enzyme est une cible privilégiée pour certains agents anticancéreux. En effet, les cellules cancéreuses se divisent plus rapidement que les cellules saines et nécessitent donc un turnover important des cofacteurs folates. L'arrêt ou le ralentissement de ce turnover permet de bloquer la synthèse nucléotidique et donc la mitose. Ce déficit en acides nucléiques provoque également une incorporation erronée de bases azotées au sein de la molécule d'ADN. Les systèmes de réparation de l'ADN ne disposant plus des nucléotides nécessaires, des cassures sur les brins d'ADN apparaissent. La mort cellulaire intervient alors par nécrose ou apoptose (McGuire et al. 2003).

Les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (Figure 13) ont donc des propriétés antinéoplasiques, antibiotiques et antiparasitaires. Beaucoup de ces molécules ont des structures qui imitent celles de noyaux pterines ou pyrimidines. Le chef de file de ces inhibiteurs est le methotrexate, un analogue du dihydrofolate, utilisé comme anticancéreux. Très toxique, cette molécule n'est pas utilisée comme antiparasitaire. Pour ce type de traitement, ces molécules sont le plus souvent utilisées à très faible concentration ($< \mu\text{M}$) afin de diminuer leurs toxicités, mais en association avec d'autres inhibiteurs, comme par exemple des anti-DHPS (voir plus haut). Dans le cas du paludisme, l'efficacité de ce type de combinaison n'est plus à démontrer puisque les anti-DHFR se retrouvent dans de nombreux médicaments (Tableau 2).

Tableau 2 : Quelques spécialités utilisées contre le paludisme ou la toxoplasmose.

Spécialités	Drogue 1	Drogue 2
Malarone® (paludisme)	Proguanil (anti-DHFR)	Atovaquone (bloque la respiration mitochondriale)
Fansidar® (paludisme/toxoplasmose)	Pyrimethamine (anti-DHFR)	Sulfadoxine (anti-DHPS)
Lapdap® (paludisme) (retiré du marché en 2008)	Chlorproguanil (anti-DHFR)	Dapsone-(anti-DHPS)
Malocide®-Adiazine® (toxoplasmose)	Pyrimethamine (anti-DHFR)	Sulfadiazine (anti-DHPS)
Artémisine®-Méfloquine® (paludisme)	Artémisine (détruit la membrane du parasite)	Méfloquine (bloque la protéolyse de l'hémoglobine)

3. résistance aux inhibiteurs

Un problème très fréquemment rencontré dans le cas de traitement de maladies infectieuses est l'apparition de résistances qui se développent face à presque tous les inhibiteurs connus. Les antifolates n'échappent pas à cette règle et différents types de résistance ont été répertoriés qui mettent en jeu dans la plupart des cas des mutations au niveau des chromosomes ou des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour les deux enzymes. Ces mutations peuvent entraîner :

- Une hyperproduction d'enzyme, ou production d'enzyme ayant une affinité modifiée vis-à-vis des inhibiteurs.

- Une modification de la structure de l'enzyme. Par exemple, une double mutation de la DHFR humaine (la phenylalanine 31 devient une arginine et la glutamine 35 est transformé en glutamate) change la conformation de l'enzyme et empêche la fixation du Methotrexate dont l'affinité pour l'enzyme devient 600 fois plus faible (Volpato et Pelletier 2009).

- Un changement de la perméabilité membranaire vis-à-vis des inhibiteurs, diminuant leur incorporation dans la cellule et donc leur toxicité.

Pour le moment, il n'est pas possible d'empêcher l'apparition des résistances, mais on peut les retarder en contrôlant rigoureusement les traitements administrés et en empêchant le mauvais dosage des médicaments.

Ces problèmes de résistance conduisent à chercher régulièrement de nouvelles molécules afin de remplacer celles devenues inefficaces, et/ou d'identifier de nouvelles cibles. En effet, d'autres enzymes de la voie de biosynthèse du THF sont des cibles potentielles. Parmi les neuf autres enzymes impliquées dans la synthèse de ce cofacteur, celles qui contrôlent la synthèse du pABA nous semblent particulièrement intéressantes pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il est raisonnable de penser que bloquer la synthèse du pABA aura un effet antibiotique puisque c'est le cas lorsque son utilisation est bloquée (par les sulfamides). De ce point de vue, il est intéressant de noter qu'une mutation de l'enzyme PabB impliquée dans la formation du pABA chez *E. coli* inhibe la croissance des bactéries (Rayl et al. 1996). De plus, il a été montré que la production du pABA, avec celle des ptérines, est un facteur limitant la synthèse des folates dans les cellules végétales. Dans le chapitre suivant nous allons décrire en détail les étapes qui conduisent à la synthèse du pABA, ainsi que les recherches déjà effectuées sur les enzymes concernées et ayant pour but l'identification de nouvelles molécules inhibitrices à intérêt thérapeutique.

III. La voie de biosynthèse du pABA : une cible potentielle

A. les enzymes impliquées

1. ADC Synthase

L'ADC Synthase (ADCS) est la première enzyme impliquée lors de la formation du pABA. En présence de chorismate et de glutamate, elle permet la formation de

l'aminodeoxychorismate (ADC) qui va ensuite être transformé en pABA grâce à une ADC Lyase (ADCL).

Le chorismate est le produit final de la voie du shikimate, voie que l'on retrouve chez les plantes, les bactéries, les champignons et de nombreux protozoaires, dont les apicomplexes. Parce qu'elle utilise le chorismate comme substrat, l'ADCS fait partie du groupe des enzymes à chorismate (figure 14) (Payne et al. 2009) comme l'anthranilate synthase (AS), l'isochorismate synthase (IS) et la salicylate synthase (SS).

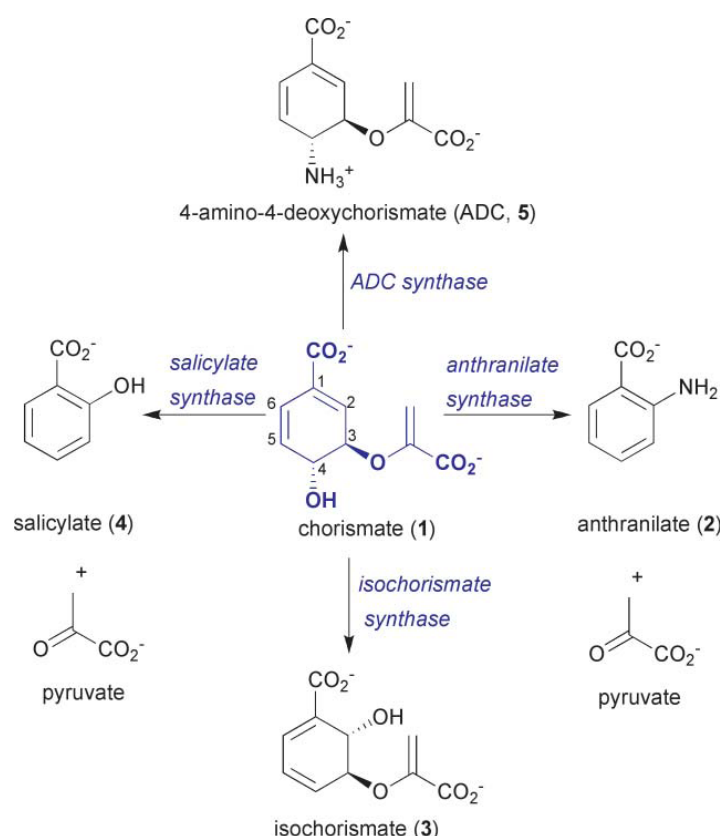


Figure 14 : Enzymes à chorismate. L'ADC synthase transforme le chorismate en pABA, l'anthranilate synthase transforme le chorismate en anthranilate, la salicylate synthase produit du salicylate à partir du chorismate et l'isochorismate mutase de l'isochorismate.

Il existe une forte homologie de séquence (environ 30% d'identité) et aussi une analogie structurale entre les domaines de fixation du chorismate de ces quatre enzymes (Spraggon et al. 2001) (Parsons et al. 2002). Par exemple, les études structurales menées sur PabB, l'ADCS d'*E. coli*, montre de nombreuses similitudes avec la sous-unité TrpE de l'anthranilate synthase. TrpE est allostériquement régulée par le tryptophane, produit terminal de la voie de biosynthèse dans laquelle est impliquée l'anthranilate synthase (Morollo et Eck 2001). Bien que PabB ne soit pas régulée par le tryptophane, une molécule de tryptophane est

enfouie dans la structure et pourrait jouer un rôle important dans le repliement et la stabilité de PabB (Parsons et al. 2002). Cette observation suggère que PabB et TrpE sont liées d'un point de vue évolutif.

L'ADCS catalyse le remplacement du groupe hydroxyle en *para* par une fonction amine, selon le mécanisme réactionnel suivant :

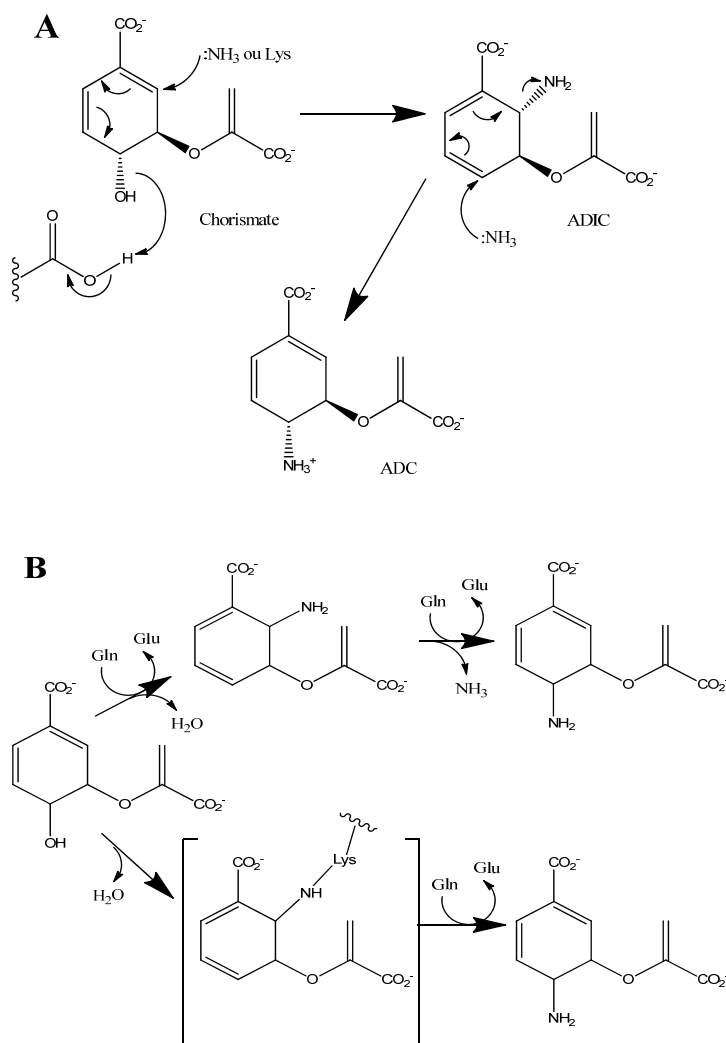


Figure 15 : Mécanisme réactionnel de l'ADC synthase. A, mécanisme de substitution du groupe hydroxyle en C-4 par une fonction amine. B, l'attaque nucléophile sur le C-2 peut s'effectuer soit par du NH₃ libre (cas de *B. subtilis*), soit par un résidu lysine du site catalytique (cas d'*E. coli*).

Selon les organismes, deux mécanismes semblent exister. Le premier, décrit chez *E. coli*, implique un résidu lysine (K274) pour l'attaque nucléophile sur le C-2 du chorismate. Ce résidu lysine est très conservé chez beaucoup d'espèces. Dans ce cas, l'intermédiaire aminodeoxyisochorismate (ADIC) n'est pas libéré dans le milieu. Par contre, chez *B. subtilis*, la lysine K274 est remplacée par une alanine. En conséquence, l'attaque nucléophile n'est pas

effectuée chez ces organismes par une lysine mais par une molécule de NH_3 libre, produisant ainsi un intermédiaire ADIC, non lié de façon covalente à la protéine (Schadt et al. 2009). La molécule de NH_3 nécessaire à cette attaque nucléophile provient de l'hydrolyse d'une molécule de glutamine. Ainsi, chez *B. subtilis*, deux NH_3 , et donc deux glutamines, sont nécessaires pour la formation de l'ADC, alors qu'une seule suffit chez *E. coli*

Le schéma ci-dessus montre que la glutamine est une source de NH_3 pour la synthèse d'ADC. L'activité ADCS doit donc être associée à une activité glutamine amidotransférase (GAT). Chez les bactéries, cette activité est portée par la protéine PabA qui forme un hétérodimère avec PabB (Roux et Walsh 1992). Chez ces organismes, PabA seule n'a pas d'activité GAT et doit être impérativement associée à PabB pour hydrolyser la glutamine en glutamate. A l'inverse, PabB seule possède une activité ADCS lorsque du NH_3 est ajouté dans le milieu d'incubation (Ye et al. 1990). Toutefois, le NH_3 présent dans le milieu extérieur, contrairement à la glutamine, présente un K_m pour la formation d'ADC supérieur à 100 mM (celui de la glutamine est d'environ 1 mM), ce qui suggère fortement que ce n'est pas le substrat naturel (Viswanathan et al. 1995). Le K_m pour le chorismate (représentatif de l'affinité de PabB pour son substrat) est de l'ordre de 5 μM , comparable à la valeur rapportée pour les autres enzymes à chorismate (Payne et al. 2009). Le couplage entre les activités GAT et ADCS est mal connu, mais compte tenu de ces observations, il a été postulé que le NH_3 libéré par l'activité GAT n'est pas relargué dans le milieu extérieur mais canalisé vers le domaine ADCS, le canal nécessaire au transfert apparaissant lors de la formation de l'hétérodimère PabA-PabB. Un tel mécanisme de transfert de NH_3 est décrit au niveau structural pour d'autres enzymes de la famille des glutamine aminotransférases de classe I, telle que la carbamoyl phosphate synthetase (Fan et al. 2009) .

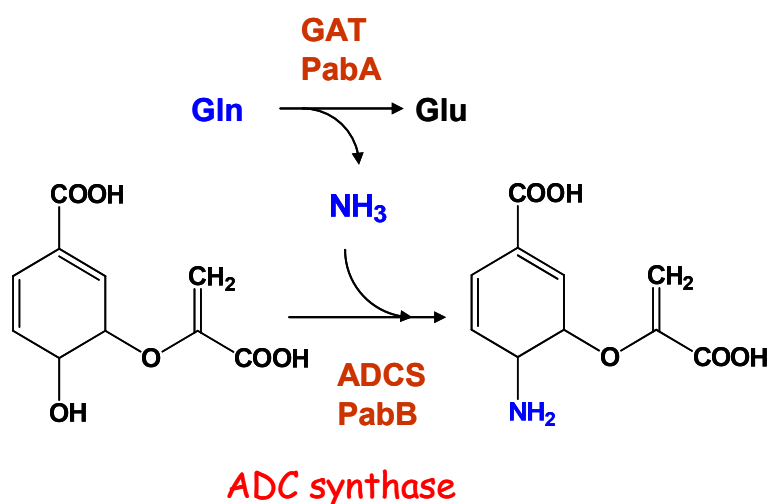


Figure 16 : La synthèse de l'ADC à partir de chorismate. La première étape est catalysée par PabA et PabB dans *E. coli* et par l'ADC synthase dans les organismes eucaryotes. Cette première étape implique deux réactions: une activité GAT pour fournir le groupement NH_3 , et une activité ADCS pour remplacer le groupe hydroxyle en position C4 du chorismate par du NH_3 .

Chez *Arabidopsis*, l'ADC synthase est codée par un gène unique At2g28880. Ce gène code pour une protéine bifonctionnelle localisée dans le plaste (Basset et al. 2004a). En effet, l'enzyme de plante présente une activité GAT associée avec la partie N-terminale de la protéine et une activité ADCS associée avec la partie C-terminale. En fait, l'enzyme de plante correspond à la fusion des deux enzymes bactériennes PabA et PabB. Le domaine GAT de la GAT-ADCS de plante, tout comme PabA, appartient à la famille des glutamine aminotransférases de classe I, famille qui contient, entre autres, la sous unité TrpG de l'anthranilate synthase, la carbamoyl phosphate synthetase, la GMP synthetase ou encore la sous unité PDX2 de la pyridoxal phosphate synthase. Une première étude sur l'enzyme recombinante d'*Arabidopsis* a permis de montrer qu'il s'agit d'un monomère de 95 kDa (Sahr et al. 2006a). Les premiers paramètres cinétiques (V_m et K_m) pour la glutamine et le chorismate (représentatifs de l'activité de chaque domaine) ont été déterminés et montrent que l'enzyme de plante se comporte de façon similaire à ses homologues bactériens PabA et PabB. Cette étude a aussi montré que le dihydrofolate et le méthotrexate se comportent comme des inhibiteurs compétitifs de la glutamine avec des K_i respectifs de l'ordre de 10 et 1 μM . La signification physiologique de l'inhibition par le dihydrofolate n'est pas claire, la teneur en dihydrofolate étant certainement très inférieure à 10 μM dans le compartiment chloroplastique. L'instabilité de l'enzyme recombinante n'avait malheureusement pas permis de pousser plus en avant cette étude.

2. ADC Lyase

L'ADC lyase (ADCL) est la deuxième enzyme de la voie de synthèse du pABA. Elle catalyse la coupure de la chaîne latérale de l'ADC pour former du pABA et libérer du pyruvate (Figure 17).

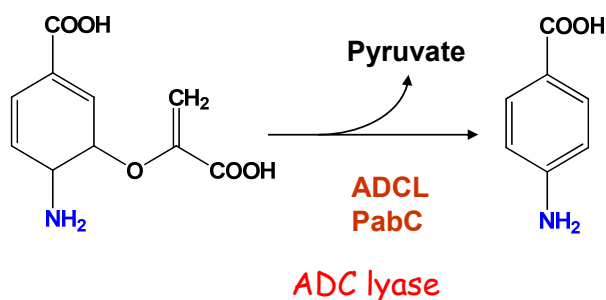


Figure 17 : Réaction catalysée par l'ADC lyase.

L'ADC lyase (ADCL) est une enzyme contenant un pyridoxal 5'-phosphate (PLP, forme active de la vitamine B6) (Nakai et al. 2000). Les enzymes à PLP sont classées en 5 groupes, et l'ADC lyase fait partie des enzymes à PLP de classe 4. Ce groupe inclut les D-amino acid aminotransférases (D-AAT) et les branched-chain L-amino acid transférases (BCAT). Les D-AAT catalysent les formations de D-glutamate et de D-alanine, les BCAT catalysent la transamination réversible entre un acide aminé branché et un acide α -cétonique. L'ADCL est une enzyme classée dans la famille des BCAT.

Chez les bactéries l'ADC lyase est nommée PabC. Cette activité a été caractérisée et le gène codant identifié (Nichols et al. 1989) (Green et Nichols 1991). La structure tridimensionnelle de l'enzyme a été aussi établie (Nakai et al. 2000). Il n'existe qu'une faible homologie de séquence entre les différentes ADC lyase connues, ce qui rend difficile l'identification de ces enzymes chez les organismes où elle n'a pas été encore identifiée. En effet, une simple recherche par comparaison de séquence dans la banque de donnée génomique d'*Arabidopsis* conduit à plus d'une dizaine de possibilités. Toutefois, si l'on considère que cette enzyme doit être présente dans le compartiment plastidial, le nombre de possibilités est plus restreint. En utilisant cette stratégie, un gène de plante a été identifié (At5g57850) et il a été montré que ce gène était capable de compléter un mutant de *E. coli* déficient en PabC (Basset et al. 2004d). Toutefois, l'enzyme de plante n'a pu être surexprimée en quantité suffisante pour permettre une étude biochimique approfondie.

B. Recherche d'inhibiteurs de l'ADC synthase

Compte tenu du fait que le chorismate représente un carrefour métabolique important, les enzymes à chorismate sont des cibles antibiotiques potentielles et un certain nombre de recherches actuelles ont pour but de découvrir de nouveaux inhibiteurs efficaces contre ces enzymes. Dans ce contexte, des travaux, encore peu nombreux, font état de recherches visant à inhiber l'ADCS. Pour l'instant tous ces travaux sont focalisés sur l'enzyme bactérienne PabB. Ces recherches impliquent le plus souvent des expériences de design d'analogues du chorismate en s'appuyant sur les données structurales de l'enzyme (Parsons et al. 2002) (Bulloch et al. 2004), ou des approches de chimie combinatoire qui associent des inhibiteurs potentiels avec une structure analogue à celle du chorismate, structure qui permet de diriger la molécule inhibitrice vers le site actif (Kozlowski et al. 1995) (Ziebart et al.). Une troisième approche décrite dans la littérature consiste en un criblage d'une collection d'extraits naturels de microorganismes marins (Keller et al. 2007). Dans ces expériences, les auteurs mesurent l'effet de ces extraits sur la croissance d'une souche de *B. subtilis*, et estiment la spécificité des inhibiteurs envers la synthèse de pABA par la réversion de l'inhibition lorsque du pABA est ajouté dans le milieu de culture. Quelques exemples d'inhibiteurs de l'ADCS et leurs K_i respectifs sont présentés sur la Figure 18. Jusqu'à présent, le meilleur inhibiteur obtenu par ces différentes approches présente un K_i mesuré sur l'enzyme purifiée de 38 μM .

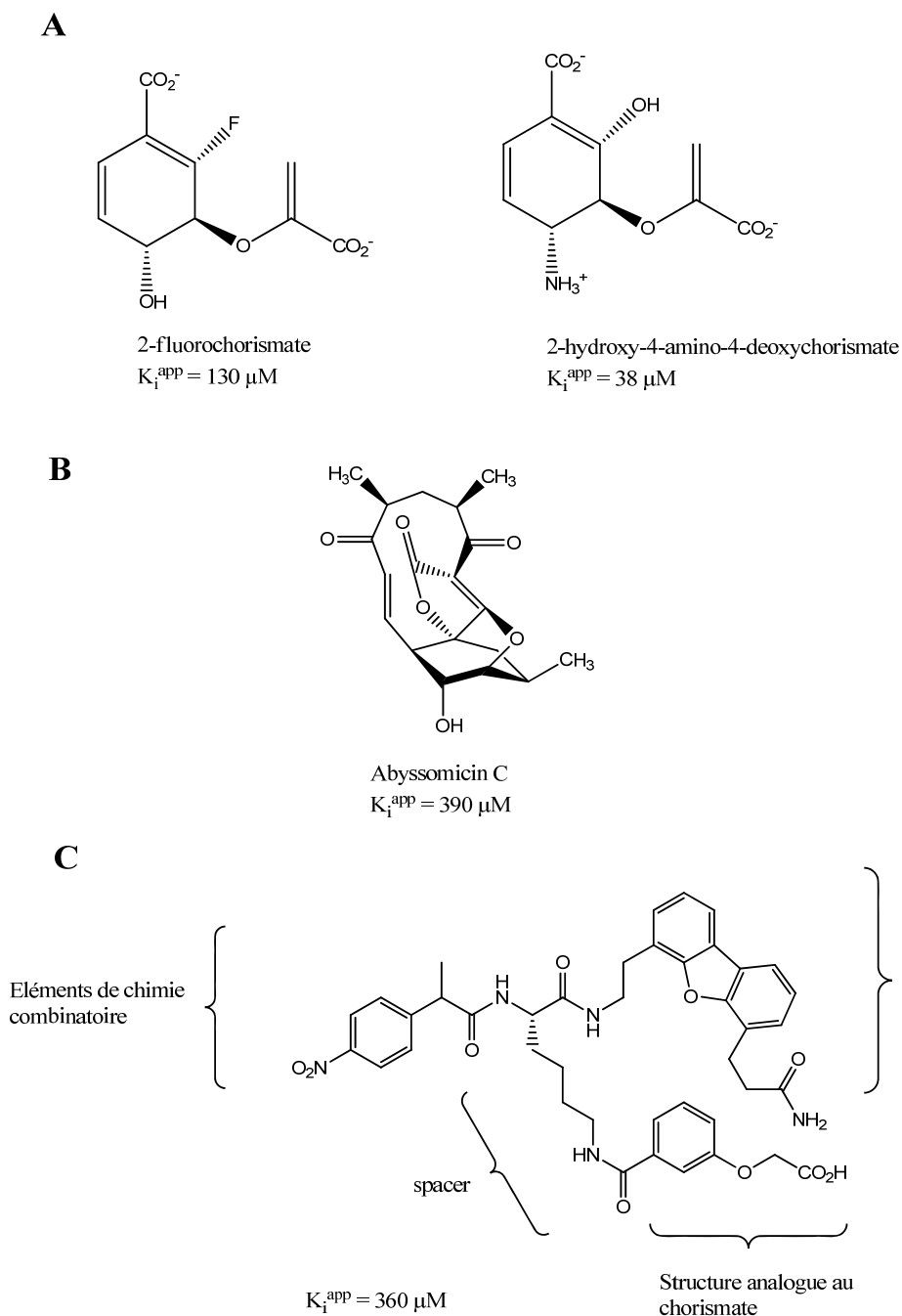


Figure 18 : Quelques exemples de molécules ayant une activité inhibitrice sur l'activité ADCS de PabB. A : analogues du chorismate (Bulloch et al. 2004) ou de l'ADC (Kozlowski et al. 1995); B : Abyssomicin C identifiée à partir d'un extrait d'actinomycète marin *Verrucosispora* AB-18-032 (Keller et al. 2007); C : Molécule issue d'une approche de chimie combinatoire. La structure analogue au chorismate permet de diriger l'ensemble vers le site actif. Le 'spacer' permet d'étendre le reste de la molécule hors du site actif et relie les éléments issus de la librairie combinatoire à la partie ancrée dans le site actif (Ziebart et al.).

IV. Objectif de ce travail

Au cours de cette thèse, nous essaierons de purifier les GAT-ADCS de plantes (*Arabidopsis*) et d'apicomplexes (*Toxoplasma* et *Plasmodium*) et de comparer leurs propriétés cinétiques. Cette première partie du travail devrait permettre de compléter nos connaissances, pour le moment très fragmentaires, des mécanismes catalytiques de cette enzyme bifonctionnelle. Puis, dans un deuxième temps, nous rechercherons, par une approche de criblage à haut débit d'une librairie de composés chimiques, des molécules actives sur la fonction catalytique de l'enzyme recombinante purifiée. Les molécules les plus prometteuses seront testées plus en avant afin de déterminer leurs K_i et, si possible, de comprendre leurs mécanismes d'inhibition. Enfin, dans un troisième temps, nous essaierons de mesurer l'impact de ces molécules sur la teneur en folate des plantes, reflet de leurs spécificités d'action, ainsi que leurs potentiels herbicides et antiparasitaires. Pour ce dernier aspect, nous utiliserons surtout le parasite *T. gondii*, plus facile à manipuler que *P. falciparum*, et nous estimerons la capacité des inhibiteurs précédemment identifiés à bloquer la prolifération de ces parasites.

MATERIEL ET METHODES

I. Surexpression et purification des protéines recombinantes en système bactérien-

A. Clonage dans les vecteurs d'expression pet28b⁺ et pet21b⁺

Les gènes d'intérêts sont amplifiés par PCR à partir d'une banque d'ADN complémentaire d'*A. thaliana*, de *T. gondii* et de *P. falciparum*.

Nous avons aussi fait construire un gène de synthèse de la GAT-ADCS de *P. falciparum* (Geneart, Allemagne). En effet, le génome de *P. falciparum* étant biaisé en A et T (il est constitué d'environ 80% de bases A et T), nous avons fait construire un gène à partir de la séquence en acides aminés de la PfGAT-ADCS. Le gène de synthèse de la PfGAT-ADCS a été construit de manière à ce que son expression soit optimisée pour l'usage codon d'*E. coli*.

Les primers utilisés permettent d'avoir en amont et en aval du gène amplifié les sites de restriction nécessaires au clonage. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés dans les vecteur pet28b⁺ et pet21b⁺ de manière à obtenir des protéines ayant une étiquette histidine soit en région N-terminale (pet28b⁺), soit en région C-terminale (pet21b⁺).

B. Surexpression des protéines recombinantes en système bactérien

Les bactéries de la souche BL21 (DE3) RIL (Stratagene) permettent de traduire efficacement les codons rares présents dans les gènes d'origine végétale ; elles sont cultivées en présence des antibiotiques adaptés à chaque plasmide : kanamycine (50µg/ml) pour les constructions dans le vecteur pet28b⁺ et carbenicilline (34 µg/ml) pour celles qui sont dans les vecteurs pet21b⁺.

1. Expression des ADC synthase (GAT-ADCS)

La culture des bactéries se fait dans du milieu M9 (milieu minimum contenant 1 mM MgSO₄, 0.1 M CaCl₂, glucose 0.2 % (p/v) à 17 °C en présence de tryptophane (Trp) 5 µM. Les GAT-ADCS ont un site de fixation putatif du Trp sur le domaine ADCS. Cet acide aminé aurait un rôle dans repliement de la protéine. L'IPTG est ajouté à une concentration finale de 200 µM lorsque la D.O. atteint 0,6. La culture des bactéries est alors prolongée pendant 24 h.

2. Expression de l'ADC lyase (ADCL)

L'expression des ADC lyases se fait dans du milieu Luria Bertani (LB) additionné de sorbitol (0.6 M) de bétaine (5 mM) et de chlorure de pyridoxine (25 µg/ml). Les cultures sont effectuées à 17° C, et l'induction de l'expression est faite en ajoutant de l'IPTG à une concentration finale de 200 µM lorsque les bactéries ont atteint une D.O. de 0,6. L'expression de la protéine est maintenue pendant 24 h.

3. Expression des protéines à domaines GAT

La culture des bactéries se fait dans du milieu M9 (milieu minimum contenant 1 mM MgSO₄, 0.1 M CaCl₂, 0.2 % glucose) à 17° C. La production de la protéine se fait par ajout de l'IPTG à une concentration finale de 200 µM lorsque la D.O. atteint 0,6. La culture est prolongée pendant 24 h.

C. Purification et dosage des protéines recombinantes

1. Purification sur résine Ni-Sepharose

Après le temps de culture désiré, les bactéries sont centrifugées à 4000 g pendant 30 minutes. Le culot bactérien est ensuite repris dans un tampon A (Tris /HCl 100 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, glycérol 10%, cocktail d'inhibiteurs protéases (Roche Applied Science[®]). Pour la GAT-ADCS on ajoute dans le tampon A de la glutamine 10 mM et du tryptophane 10 µM (tampon B) et pour l'ADCL de la Pyridoxine phosphate 50 µM (tampon C). Pour les protéines à domaines GAT, on ajoute uniquement de la glutamine 10 mM dans le tampon A.

Les bactéries sont lysées par sonication puis centrifugées 40 minutes à 20 000 g à 4 °C. Les protéines solubles sont ensuite déposées sur une colonne de Nickel-Sepharose (Ni-Sepharose[™] High Performance, GE Healthcare[®]) préalablement équilibrée avec le tampon B pour la GAT-ADCS et le tampon C pour l'ADCL. Les différents lavages sont successivement faits avec les tampons ayant servi à l'équilibrage et contenant de l'imidazole 15 mM, puis 30 mM et 50 mM. L'élution est faite en présence d'imidazole 200 mM.

La protéine éluée est immédiatement dessalée par passage sur une colonne de type gel filtration PD 10 (GE healthcare) afin d'éliminer l'imidazole qui peut dans certains cas dénaturer les protéines ou inhiber leurs activités. Les protéines sont éluées dans le tampon B ou C et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2. Purification par chromatographie de partage

La purification sur colonne Ni-Sepharose est suivie d'une purification sur gel filtration. La colonne utilisée est une S200 16/60 (GE Healthcare). La colonne est équilibrée avec du tampon Tris/HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, glycérol 10 %, NaCl 100 mM. Les protéines sont séparées en fonction de leur taille : les protéines agrégées sortent en premier de la colonne, dans le volume mort ; les protéines les plus petites sortent en dernier. Cette purification par chromatographie de partage permet de déterminer la taille des protéines en comparant leurs éluions avec celles de protéines standards dont le poids moléculaire est connu.

3. Dénaturation des protéines à l'urée 8M

Lorsque les protéines exprimées dans *E. coli* ne sont pas solubles, elles s'agrègent et forment des corps d'inclusion. Pour solubiliser ces protéines, on peut faire une dénaturation à l'urée 8 M.

Suite à la sonication et à la centrifugation à 14000 g, les protéines insolubles sont remises en suspension dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 % (v/v) triton X100 et incubées à température ambiante pendant 15 minutes. L'ajout de triton 1% permet de solubiliser les protéines membranaires piégées dans le culot. Puis la solution de protéine est centrifugée à 16000 g pendant 20 minutes. Cette opération est répétée 3 fois, elle permet de se débarrasser des protéines membranaires. Ensuite, les corps d'inclusions sont repris dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5, urée 8 M, DTT 5 mM et incubés à température ambiante pendant 1h.

4. Renaturation des protéines sur boudin de dialyse

Les protéines dénaturées à l'urée 8 M sont dialysées dans un boudin de dialyse (Spectra/por ; MWCO 3,5) pendant 12h à 4 °C contre un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM dans un volume équivalent à 100 fois celui de l'échantillon protéique.

5. Dosage de la quantité de protéine

La quantité de protéines est estimée selon la technique de (Bradford 1976), en utilisant le sérum albumine bovine comme standard.

6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-page

Les gels de polyacrylamide sont constitués d'un gel de concentration [acrylamide 5 % (p/v)] et d'un gel de séparation [acrylamide 10 % (p/v)]. L'électrophorèse est conduite à voltage constant (200 V) (Power Pac 100, BIO RAD) dans du tampon de migration [Tris 25 mM / glycine 192 mM (pH final de 8,3) ; SDS 0,1 % (p/v)], à température ambiante pendant 1 h. Après électrophorèse, les protéines sont colorées au bleu de Coomassie R-250.

II. Mesure de l'activité enzymatique des GAT-ADCS et ADCL

A. Mesure des activités GAT-ADCS et ADCL au spectrophotomètre par absorbance

1. Mesure de l'activité du domaine GAT de la GAT-ADCS couplée avec l'activité de la glutamate déshydrogénase (GDH)

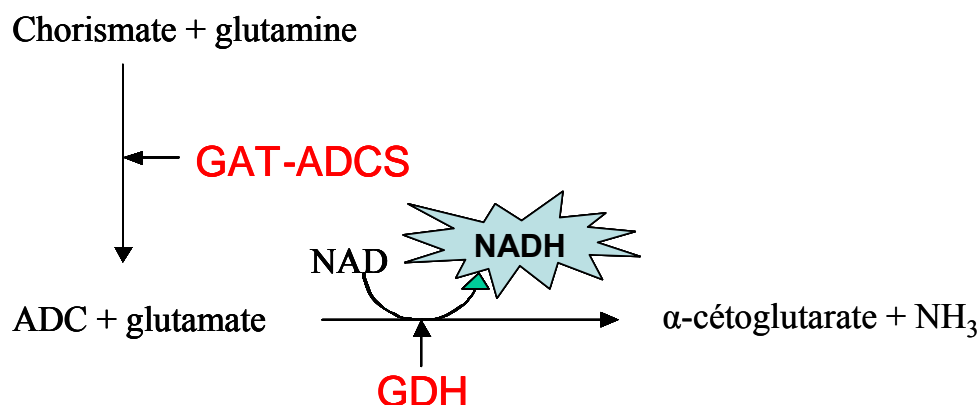


Figure 19 : dosage du glutamate produit par la GAT-ADCS.

La méthode utilisée consiste à doser le glutamate formé en présence de glutamine et de chorismate (Sahr et al, 2006). Le dosage se fait en deux étapes : dans un premier temps, l'enzyme est mise en présence de ses deux substrats (glutamine et chorismate) pendant un temps donné. Pour un volume final de 200 µl, le milieu réactionnel contient : tampon A (Tris-HCl 100 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM), glutamine et chorismate à des concentrations variables, la AtGAT-ADCS purifié à une concentration finale d'environ 20 µg/ml. L'échantillon est incubé à 37°C pendant le temps voulu (5, 10, 20 et 40 minutes), puis la réaction est stoppée en portant l'échantillon à 100°C pendant 3 minutes. Des contrôles sont systématiquement effectués, en omettant soit la glutamine, soit le chorismate, soit les protéines.

Dans un deuxième temps, on dose le glutamate formé dans 100 µl du milieu réactionnel précédent en présence de NAD et de glutamate déshydrogénase (GDH), en suivant au spectrophotomètre (longueur d'onde 340 nm) l'apparition de NADH (Czok et Lamprecht 1974). La réaction est conduite en ajoutant pour chaque échantillon 400 µl d'un tampon glycine-hydrazine (0.5M-0.4M, pH 9) contenant : NAD (1 mM), ADP (1 mM) et GDH (100 µg/ml). L'hydrazine se fixe à α-cetoglutarate et empêche le retour de la réaction.

Nous avons aussi cherché à simplifier le dosage en mesurant en continu dans la cuve du spectrophotomètre l'activité de la GAT-ADCS. La cuve du spectromètre (température 37°C) contient pour un volume de 500 µl de tampon A des concentrations variables de glutamine, 200µM de chorismate, 1 mM de NAD et 50 µg/ml de GDH. La réaction catalysée par la GDH étant réversible, on met un large excès en NAD, pour favoriser la réaction dans le sens de la formation du NADH. On n'utilise pas le tampon glycine-hydrazine parce qu'il agit sur

l'activité de la GAT-ADCS. La réaction est démarrée par l'addition de la GAT-ADCS ou de la glutamine, et la formation de NADH est suivie à 340 nm.

2. Mesure de l'activité GAT-ADCS et ADCL couplée avec celle de la lactate déshydrogénase (LDH)

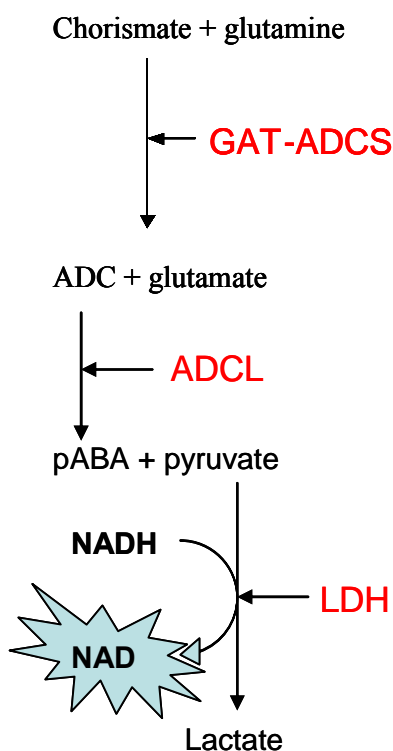


Figure 20 : Dosage du pyruvate produit en couplant l'activité de la GAT-ADCS avec celle de l'ADCL.

On utilise une méthode similaire à celle du dosage du glutamate formé par le domaine GAT de la GAT-ADCS. Cette fois-ci on mesure l'apparition du pyruvate, produit final des réactions catalysées par la GAT-ADCS et l'ADCL. Pour cela, on couple les deux premières enzymes avec une troisième : la lactate déshydrogénase (LDH).

En présence de NADH, la LDH est capable de transformer le pyruvate en lactate, en oxydant le NADH. On observe au spectrophotomètre à 340 nm une baisse du NADH. On peut ainsi doser en deux temps ou en continu la formation du pyruvate.

Pour le dosage en deux temps, dans un volume final de 200 µL de tampon A, on incube pendant un temps donné (5, 10, 20 et 40 minutes), les deux enzymes GAT-ADCS (25 µg/ml) et ADCL (2 µg/ml) avec les substrats chorismate et glutamine à des concentrations variables. L'échantillon est incubé à 37 °C pendant le temps voulu (5, 10, 20 et 40 minutes),

puis la réaction est stoppée en portant l'échantillon à 100 °C pendant 3 minutes. Des contrôles sont systématiquement effectués, en omettant soit la glutamine, le chorismate ou les protéines.

On dose ensuite au spectrophotomètre à 340 nm le pyruvate formé dans 100 µL de la réaction précédente dans un volume final de 500 µL de tampon A en présence de LDH (144 µg/ml) et de NADH (140 µM).

Le pyruvate formé peut aussi être dosé directement, pour cela on met les trois enzymes aux mêmes concentrations que pour le dosage en deux temps dans un volume final de 500 µl en tampon A en présence de concentrations variables en glutamine (0 à 500 µM), de chorismate (200 µM) et de NADH (140 µM). La vitesse de la réaction est là encore suivie par la mesure de la décroissance à 340 nm du NADH.

La réaction catalysée par la LDH bien que réversible est largement orientée dans le sens de la formation du lactate.

B. Mesure des activités GAT-ADCS et ADCL au spectrofluorimètre

Les méthodes de mesure par fluorescence permettent souvent d'avoir un gain de sensibilité par rapport aux méthodes par absorbance. Ainsi la détection du NADH par fluorescence (longueur d'onde d'excitation 340 nm, longueur d'onde d'émission 450 nm) est environ dix fois plus sensible que par absorbance à 340 nm. D'autre part, le pABA peut-être directement détecté par fluorescence (longueur d'onde d'excitation 290 nm, longueur d'onde d'émission 340 nm). La grande sensibilité de ces dosages permet aussi de miniaturiser les tests et d'utiliser des plaques multi puits, une méthode avantageuse dans le cas d'une approche de criblage à haut débit nécessitant un protocole robotisé.

1. Mesure de l'activité du domaine GAT de la GAT-ADCS couplée avec celle de la glutamate deshydrogénase

Pour réaliser ce dosage, nous avons couplé l'activité du domaine GAT de la GAT-ADCS avec celle de la GDH. Le protocole utilisé est identique à celui décrit pour le dosage par absorbance, le volume réactionnel est toutefois beaucoup plus faible. Le dosage est réalisé dans des plaques Greiner (96 puits) dans 80 µl de milieu réactionnel [Tris/HCl 100 mM (pH8), MgCl₂ 5 mM, glycérol 5 % (v/v), glutamine (0 – 500 µM), chorismate (0 - 200 µM),

NAD 1 mM, AtGAT-ADCS (9 µg/ml) et GDH (100 µg/ml)]. La production de NADH est suivie par l'émission de fluorescence à 450 nm (Exc : 340 nm) sur un spectrofluorimètre Safir (Tecan). Cette méthode de dosage sera utilisée pour le criblage à haut débit.

2. Mesure du couplage des activités GAT-ADCS et ADCL par fluorescence

Pour observer la formation du pABA au cours du temps, on couple l'activité des deux enzymes GAT-ADCS et ADCL. Le pABA formé est déterminé à 340 nm (excitation 290 nm). Le dosage est réalisé dans des plaques Greiner (96 puits) dans 80 µl de milieu réactionnel [Tris/HCl 100 mM (pH8), MgCl₂ 5 mM, du glycérol 5 % (v/v), glutamine (0 - 0.5 mM), chorismate (0 - 0.2 mM), AtGAT-ADCS (9 µg/ml) et ADCL (20 µg/ml)].

C. Mesure de l'activité GAT-ADCS et ADCL en RMN

Le spectromètre utilisé pour réaliser les expériences de RMN (résonance magnétique nucléaire) est un appareil de chez Bruker (AMX 400, WB). Il nous permet de détecter simultanément les concentrations de glutamine, NH₃, ADC et pABA en utilisant de la glutamine marquée sur les fonctions amine et imine ([2,5]-¹⁵N- L-glutamine).

Le tableau 3 nous indique les différentes conditions expérimentales requises pour l'étude des composés marqués au ¹⁵N. Le temps d'acquisition de chaque spectre est de 30 minutes.

Tableau 3: Modalité d'analyse en RMN du ¹⁵N.

Spectromètre utilisé	AMX 400 WB Diamètre de la sonde : 10 mm
Noyaux étudiés	¹⁵ N
Fréquence d'excitation	40.55 MHZ
Durée et angle d'excitation (α)	8 µs (α = 70°)
Intervalle entre les excitations	3 s
Puissance de découplage	10 W pendant l'acquisition et 0.5 W durant le délai

Les raies obtenues sont identifiées par comparaison avec les spectres de composés purs à pH 7,5 en présence de D₂O 20 %. La quantification des raies est effectuée par un calibrage au préalable de l'intensité des raies de produits purs, enrichis ou non en ¹⁵N (2-¹⁵N-L-glutamine, 5-¹⁵N-L-glutamine, 4-¹⁵N-pABA, ¹⁵NH₄⁺).

La réaction est effectuée dans des tubes eppendorf de 2 ml avec un volume final de 1.8 ml. Les tubes eppendorf sont scellés avec un bouchon hermétique pour éviter une fuite du NH₃ dans l'atmosphère. La réaction est conduite dans le milieu [Tris/HCl 20 mM (pH 8), MgCl₂ 1 mM, glycérol 2% (v/v), 2,5-¹⁵N-L-glutamine 3 mM (enrichie 98%), chorismate 2.5 mM, 350 µg d'AtGAT-ADCS] en présence ou en absence de 400 µg d'ADCL de *E. coli*. Après 20 minutes, la réaction est stoppée par injection de 4 µl de HCl 6N (le pH final est de 4.5, à ce pH l'ammonium est sous forme NH₄⁺). Après centrifugation, les échantillons sont transférés dans des tubes RMN en présence de 400 µl de D₂O. Le spectre final représente en moyenne la somme de 18000 scans.

III. Criblage à Haut débit

Le criblage à haut débit consiste à tester de façon robotisée plusieurs centaines de molécules sur l'activité de l'enzyme. Ce criblage à haut débit a été réalisé au CMBA (Centre de Criblage de Molécules Bioactives) de l'IRTSV au CEA-Grenoble. Les molécules qui ont été testées proviennent de la chimiothèque de Prestwick®, qui contient environ 1200 molécules. Cette chimiothèque a la particularité d'être composée de molécules qui sont commercialisées et pour lesquelles un certain nombre de données physicochimiques ou toxicologiques sont déjà connues.

A. Mesure de l'activité

1. La plateforme de criblage du CMBA

La plateforme de criblage du CMBA est composée d'une station de criblage entièrement automatisée, installée sous un flux laminaire. Elle comprend : un robot de pipetage/dilution, avec cônes jetables, un bras articulé pour les transports des microplaques, un laveur de microplaques, un agitateur, un incubateur à CO₂ (Tecan Genesis 2000, Lyon,

France), un carrousel de stockage, un lecteur de codes à barre (Tecan carroussel barcode), un lecteur de microplaques (fluorescence, luminescence, absorbance) (Tecan) (figure 21).



Figure 21 : photo de la plateforme de criblage du CMBA.

2. Mise au point du test de criblage à haut débit

Lors du criblage à haut débit, nous allons doser le NADH formé par fluorescence selon la réaction décrite ci-dessous :

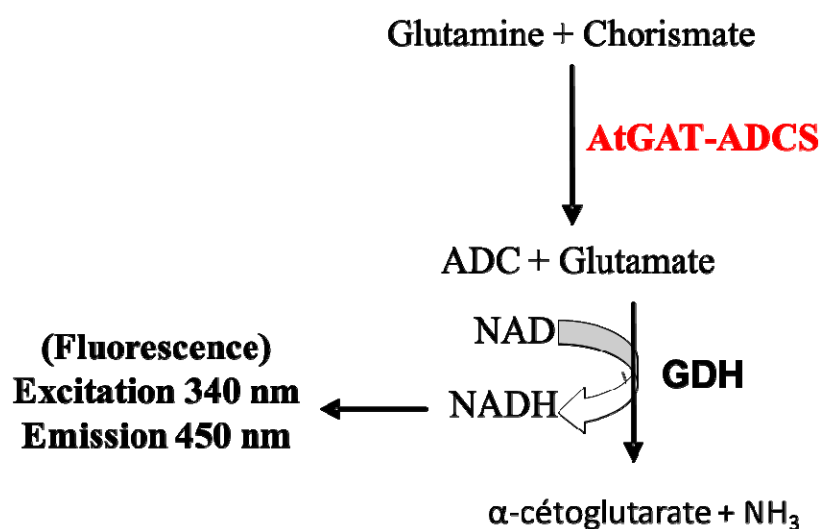


Figure 22 : Dosage du glutamate par fluorescence.

Ce test est réalisé dans les microplaques noires opaque de 96 puits (Greiner). Le volume final dans chaque puits est de 80 μ l. Le protocole pour la manipulation sur la plateforme de criblage est le suivant :

- Ajout de 50 μ L d'un mélange contenant tous les réactifs sauf la glutamine dans chaque puits de la microplaque ; La concentration de chaque réactif dans le mélange est : Tris/HCl (pH 8) 100 mM, MgCl₂ 5 mM, glycerol 5 % (v/v), chorismate 40 μ M, NAD 1 mM, GDH 2 μ g/ μ l, AtGAT-ADCS 0.014 μ g/ μ l, molécules de la chimiothèque 100 μ M.
- La réaction est déclenchée en ajoutant 30 μ l de glutamine à 1.3 mM
- Agitation orbitale de 15 secondes
- Incubation à 37 °C
- Lecture de la fluorescence sur le spectrofluorimètre intégrée à la plate-forme à 0, 15 et 25 minutes.

Les résultats sont analysés par comparaison avec le contrôle 'bio-actif' (100 % d'inhibition, représenté par la réaction mesurée en absence de glutamine) et 'bio-inactif' (0 % d'inhibition, représenté par la réaction mesurée en présence de glutamine et sans inhibiteurs).

Afin de mettre au point la fiabilité et la reproductivité du test, nous avons réalisé une trentaine de dosages avec ou sans glutamine (afin de mimer une inhibition de 100 %) sur une plaque de 96 puits identique à celle utilisée avec le robot de criblage. Nous avons ainsi calculé le facteur Z', qui est une valeur statistique sans dimension reflétant la portée du signal du test mis au point et la variation des données associées aux mesures de ce signal (Zhang et al. 1999). Ce facteur Z' nous permet d'évaluer la qualité du test mis au point et de l'optimiser. Le calcul du facteur Z' se fait selon la formule suivante : $Z' = 1 - [(3 \times (\text{écart-type du contrôle bio-actif}) + 3 \times (\text{écart-type du contrôle bio-inactif})) / \text{valeur absolue} [(\text{moyenne du contrôle bio-actif} - \text{moyenne du contrôle bio-inactif})]$. Il est significatif à partir de 30 points par contrôle. Un test de criblage idéal a une valeur de Z' comprise entre 0.5 et 1.

Lors du criblage, plusieurs problèmes peuvent survenir : l'inhibition due à un inhibiteur du domaine GAT de la GAT-ADCS peut être masquée par la fluorescence même de l'inhibiteur. Pour appréhender ce problème, le mélange de l'ensemble des réactifs, avant ajout de l'ADCS, est lu aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission du NADH, pour détecter les molécules fluorescentes dans nos conditions d'analyses. Ces molécules seront testées ultérieurement en faisant une lecture en absorbance du NADH produit.

Un autre problème lié à la lecture en fluorescence est celui du phénomène de « quenching » : la fluorescence émise par le NADH peut être captée par la molécule ajoutée, ce qui conduit à un faux positif. Ces faux positifs seront aussi éliminés par des mesures de l'activité effectuées par absorbance du NADH.

B. Criblage primaire et secondaire

Un premier criblage qu'on appelle criblage primaire est réalisé en suivant le protocole du test mis au point. Il a permis de sélectionner les molécules ayant au moins 50 % d'inhibition.

Par la suite un criblage secondaire permet de confirmer l'activité des molécules bioactives identifiées par le criblage primaire. Ce second criblage est réalisé en mesurant l'activité par fluorescence puis par absorbance afin d'éliminer les faux positifs.

IV. Organisme modèles étudiés et méthodes de culture : *A. thaliana*, *T. gondii*, *P. falciparum* et fibroblastes humains

Nous avons voulu tester *in vivo* l'effet des molécules inhibitrices sur certains organismes modèles. Ces organismes sont respectivement une plante supérieure, *A. thaliana* (dont les enzymes nous ont servis de point de départ pour le criblage), deux parasites du *phylum* des apicomplexes, *T. gondii* et *P. falciparum*, et des fibroblastes humains sur lesquels se développent les parasites. Les cultures ont été réalisées en absence ou en présence de molécules bioactives afin de déterminer les propriétés cytotoxiques éventuelles pour chacun des modèles étudiés.

A. Préparation de la solution d'éseroline

La rubreserine, molécule bioactive issue du criblage à haut débit est préparée à partir de l'éseroline fumarate (Sigma). La solution mère de rubreserine 10 mM est faite dans du tampon Tris/HCl 50 mM (pH 8) pour l'étude sur les plantules d'*A. thaliana* ; dans du tampon phosphate-Na 50 mM (pH 8) pour l'étude sur *T. gondii* et dans du PBS 1X (pH 7.5) pour celle

sur *P. falciparum*. Dans ces conditions, l'éseroline est entièrement oxydée en rubreserine au bout de 6 heures d'incubation. Ces solutions mères de rubreserine peuvent être stockées à 4° C pendant 48h ou à -20 °C pendant une semaine.

B. *A. thaliana*

1. Culture de plantules d'*A. thaliana*

Des graines d'*A. thaliana*, écotype *Columbia*, ont été stérilisées en surface (0,095 % de Tween 20 ; 0,57 % de sodium hypochlorite pendant 20 minutes) puis semées sur boîte de pétri contenant du milieu MS gélosé (400 µl de milieu Murashige et Skoog pour 1 litre, agar 15 %) et différentes concentrations des molécules à tester. Les boîtes sont ensuite placées à 4° C pendant 48 h avant d'être transférées en chambre de culture (humidité 80 % ; 20° C ; lumière blanche de densité de flux de photons de 150 µE.m⁻².s⁻¹) dans un cycle de type jour-long (12 h lumière/12 h obscurité) favorisant la croissance végétative. Les plantules restent en chambre de culture entre 10 et 15 jours.

2. Culture de cellules d'*A. thaliana*

Les cellules d'*A. thaliana* (ecotype *Colombia*) sont cultivées dans du milieu Gamborg B5 supplémenté avec 1.5 % (p/v) de sucrose. Cette suspension de cellules d'*Arabidopsis* est agitée de façon continue à 125 rpm à 22 °C sous une lumière blanche avec une densité de flux de photons de 40 µE.m⁻².s⁻¹. Les cultures sont repiquées tout les sept jours en transvasant les cellules contenues dans 50 ml de l'ancien milieu dans 200 ml de milieu neuf. En une semaine, le poids frais des cellules évolue d'environ 20 mg/ml à 80 mg/ml.

Pour déterminer l'effet d'une molécule sur la prolifération des cellules d'*A. thaliana*, on ajoute la molécule (0 – 100 µM) dans le milieu de culture au moment de l'ensemencement.

Une détermination du poids frais des cellules chaque jour nous permet de quantifier l'effet de la molécule bioactive sur la division des cellules d'*Arabidopsis*. Le repiquage se fait le septième jour dans un milieu contenant la molécule inhibitrice à la même concentration.

C. Fibroblaste humains et *T. Gondii*

Les cellules humaines HFF (Human Foreskin Fibroblasts) étudiées dans ce travail ont été sélectionnées pour permettre la propagation simple de parasites, ainsi que leur étude par des techniques d'imagerie cellulaire. Les cellules sont cultivées à 37 °C, sous 5 % de CO₂, en milieu D10 (Dulbecco Minimum Essential Medium, Gibco, additionné de sérum de veau foetal 10 % ; glutamine 1 % ; pénicilline 50 U.ml⁻¹ et streptomycine 50 µg.µl⁻¹), jusqu'à former un tapis cellulaire.

Les souches de *T. gondii* RH-YFP₂ (souche RH exprimant deux gènes codant pour la yellow fluorescente proteine), ont été maintenues en culture par passages sur tapis de cellules HFF confluentes dans du milieu D10.

1. Invasion synchronisée des cellules hôtes par *T. gondii*

Les parasites sont déposés sur des lamelles de verre recouvertes d'un tapis de cellules HFF confluentes. Après 30 secondes de centrifugation à environ 100 g pour accélérer la sédimentation des parasites sur les cellules HFF, les plaques de culture sont incubées à 37 °C pendant 15 min. Le tapis cellulaire est ensuite lavé 3 fois avec du milieu PBS (phosphate buffer saline : NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na₂HPO₄ 10 mM ; KH₂PO₄ 1,8 mM) afin d'éliminer les parasites extracellulaires. Les cellules sont alors immédiatement fixées dans 5 % de formaldéhyde/PBS pendant 30 minutes, puis elles sont stockées dans du PBS jusqu'à leur observation au microscope à épifluorescence.

2. Traitement en présence de composés candidats antiparasitaire

Pour voir l'effet d'une drogue sur *T. gondii*, deux types de test peuvent être faits : un premier test qui vérifie la capacité du parasite à envahir les cellules HFF (test d'invasion) après qu'ils aient été mis en présence de la molécule bioactive, et un second test qui analyse la

capacité des parasites à proliférer à l'intérieur des cellules humaines lorsque la drogue est dans le milieu de culture (test de prolifération). Le test d'invasion permet de mesurer l'efficacité extracellulaire de la drogue, et le test de prolifération l'efficacité intracellulaire.

Pour distinguer les parasites extracellulaires des intracellulaires, les cellules sont incubées en présence de l'anticorps primaire mAb Tg05-54 qui permet de détecter la protéine de surface de *T. gondii* SAG1, puis on utilise un anticorps secondaire qui reconnaît l'anticorps primaire (Texas Red-conjugate). Les parasites extracellulaires seront colorés en rouge vif, tandis que les parasites intracellulaires auront une faible coloration rouge. Le noyau des cellules HFF est coloré à l'Hoechst 33258, ils auront une couleur bleu.

Pour déterminer le nombre de parasites intracellulaires, on comptabilise avec un microscope à épifluorescence et contraste de phase (Zeiss Axioplan 2) le nombre de parasites présents dans 12 champs pris au hasard.

a. Le test d'invasion

Pour le traitement extracellulaire, les parasites sont incubés pendant 5 h à 37 °C avec une agitation douce, dans du milieu PBS contenant 0,1 % de DMSO et différentes concentrations des molécules à tester. Les parasites ainsi prétraités par les drogues, sont déposés, à raison de 10^6 parasites par lamelle de cellules HFF. Après une minute de centrifugation à 100 g, les parasites sédimentent sur les cellules HFF. Les plaques de cultures contenant les lamelles sont incubées à 37 °C pendant 15 minutes. Les parasites extracellulaires sont ensuite éliminés par 3 lavages successifs avec du milieu PBS. Les anticorps primaire et secondaire sont utilisés pour marquer les parasites qui seront ensuite comptabilisés au microscope.

b. Le test de prolifération

Pour le traitement intracellulaire, on réalise une invasion synchronisée de 10^6 parasites sur des lamelles de verre recouvertes d'un tapis de cellules HFF confluentes. On remplace le milieu de culture par un milieu D10 supplémenté des molécules inhibitrice (0 – 50 μ M). Après 24h de culture, les cellules parasitées sont fixées. Dans le test de prolifération on s'intéresse uniquement aux vacuoles parasitophores : on comptabilise le nombre de parasites

qu'il y'a à l'intérieur des vacuoles. On peut visualiser directement au microscope à épifluorescence les parasites qui expriment la YFP.

D. P. falciparum

La souche de *P. falciparum* est cultivée dans un sang du groupe O rhésus positif. Une solution mère de rubreserine 10 mM est faite dans du tampon PBS 1X pH 7.5, puis la solution de rubreserine est diluée deux fois dans le milieu de culture des parasites (sang). On réalise alors des dilutions en cascade pour avoir le milieu de culture avec différentes concentrations en rubreserine. Après 96 h, le degré de prolifération des parasites dans le sang est estimé en mesurant la fluorescence du SYBR Green1 qui se fixe à l'ADN du parasite (Bennett et al. 2004) (Smilkstein et al. 2004).

V. Dosage de la teneur en folate et en pABA dans des cellules d'*A. thaliana* en culture

A. Dosage de la teneur en pABA dans les cellules par HPLC

1. Préparation des échantillons de cellules

Le dosage du folate est réalisé sur 0.5 g de cellules d'*A. thaliana*. Après broyage dans de l'azote liquide, les cellules sont transférées dans des tubes de 15 ml. On ajoute 10 ml de tampon d'extraction (méthanol) puis l'échantillon est centrifugé à 5000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré et on ajoute 2 ml de tampon d'extraction au culot pour une seconde extraction. Les deux surnageants sont alors mélangés. Le méthanol est ensuite entièrement évaporé sous un flux d'azote gazeux à 35 °C. L'extrait est finalement repris par 1 ml d'eau puis soniqué pendant 5 minutes.

Pour l'analyse du pABA total, 50 µl de HCL 2 M sont ajoutés à une partie de l'échantillon qui est ensuite incubé à 80° C pendant 2 h. Ce traitement permet de rompre la liaison ester avec le glucose. Après refroidissement de l'échantillon, on ajoute 50 µL de NaOH 2 M pour neutraliser le HCl. Le pABA présent dans les deux échantillons (traité par

HCl et non traité) est extrait par l'acétate d'éthyle, comme il a été décrit précédemment (Orsomando et al. 2005).

2. Conditions du dosage HPLC et détection du pABA

Le pABA est dosé par HPLC en phase reverse. La colonne utilisée est une C18 Z225 Zorbax 5 μ m (SHANDON HPLC). Le volume d'injection de l'échantillon est de 50 μ l. L'élution est réalisée avec un gradient composé d'un mélange du solvant A et du solvant B (tableau 4). Le solvant A est constitué de tampon phosphate-Na 50 mM (pH 6) contenant du tetrabutylammonium bis sulfate 8 mM, le solvant B est le tampon A dans lequel du methanol (29 % v/v) a été ajouté.

Tableau 4 : conditions d'élution du pABA sur la colonne Z225 Zorbax 5 μ m

Temps (minutes)	Solvant A	Solvant B	Débit (ml/min)
0	82%	18%	0.8
5	60%	40%	0.8
10	50%	50%	1
13	0%	100%	1
16	82%	18%	1
21	82%	18%	0.8

Le pABA est détecté par fluorescence (Exc 270 nm ; Emi 350 nm). Dans nos conditions, le pABA est élué en 6 – 7 min.

B. Dosage de la teneur en folate dans les cellules par LC-MS/MS

1. Préparation des échantillons

0.5 g de cellules végétales ont été broyées dans de l'azote liquide en présence de dérivés du folate marqués par du ^{13}C ($^{13}\text{C}_5$ -5-MTHF, $^{13}\text{C}_5$ -THF, $^{13}\text{C}_5$ -5,10-CH⁺THF and $^{13}\text{C}_5$ -FA) qui permettront par la suite de l'identification des pics de masse et de calculer le rendement d'extraction. Après transfert de la poudre homogène dans un tube de 15 ml, 5 ml de tampon d'extraction ont été ajoutés et le tube a été placé à 100° C pendant 10 minutes puis

dans de la glace pour qu'il refroidisse. 1.5 ml de cette solution sont placés dans un tube eppendorf de 2 ml. Pour déconjuguer les folates (suppression de la queue polyglutamate), on ajoute 75 µl de sérum de rat (qui contient une activité γ -glutamyl hydrolase, permettant d'hydrolyser les glutamates) et on incube à 37° C pendant 2 h. Après refroidissement sur de la glace, la solution est centrifugée à 18 000 g pendant 15 min. Elle sera utilisée pour l'analyse LC-MS/MS.

Au cours de la préparation des échantillons, toutes les manipulations ont été réalisées sous une lumière tamisée.

2. dosage du folate par LC-MS/MS

Le dosage du folate se fait par LC-MS/MS (Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) comme décrit par Zhang (Zhang et al. 2005b) en collaboration avec le laboratoire de toxicologie de l'Université de Gent (Belgique). La chromatographie a été réalisée sur une UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters Corporation®) avec une colonne HSS Acquity T3 (150 mm x 2,1 mm; taille des particules 1,8 µm). La phase mobile est composée d'un solvant A (0,1% v/v d'acide formique dans de l'eau) et d'un solvant B (0,1% v/v d'acide formique dans l'acétonitrile) ; le débit était de 0,6 ml / min. La condition de départ (100% de solvant A) a été maintenue pendant 1 minute. Puis, la proportion de B a été augmentée de 10% pendant 2 minutes, ensuite de 12% pendant 1 minute, et enfin de 95% pendant 1 minute. Par la suite, la phase mobile a été ajustée à sa composition initiale et maintenue pendant 3 minutes. Le temps total de retention sur la colonne est de 8 minutes. Le volume d'injection était de 10 µl.

La détection a été réalisée avec un système ESI (ElectroSpray Ionisation), dans le mode MRM, en utilisant un spectromètre de masse en tandem API (Applied Biosystems 4000) (Ontario, Canada). Les conditions de la source ont été optimisées et ont été fixées comme suit: température de la source à 600 ° C, la tension à 3,5 kV ionspray, Q1 et Q3 sont exprimés dans l'unité de la résolution.

RESULTATS

CHAPITRE I : La synthèse de l'acide *p*-aminobenzoïque :
mécanisme réactionnel et propriétés biochimiques de l'enzyme
bifonctionnelle glutamine amidotransférase / aminodeoxychorismate
synthase

I. Comparaison des séquences des ADC synthases de différentes espèces

Nous avons commencé notre travail en analysant les séquences primaires des GAT-ADCS d'*A. thaliana*, *T. gondii* et *P. falciparum*. En effet le but de mon travail de thèse était dans un premier temps de produire ces enzymes et de comparer leurs propriétés biochimiques. Différents outils informatiques permettent d'analyser et de comparer des protéines *in silico* avant l'étude *in vitro*. L'alignement de séquence est un de ces outils, il permet de comparer les séquences primaires des protéines cibles. Il nous donne une idée sur les acides aminés conservés entre les protéines, et donc ceux qui semblent importants. L'arbre phylogénique est un autre outil informatique qui permet de voir l'évolution de nos protéines les unes par rapport aux autres.

A. Analyse et comparaison des séquences

Chez tous les eucaryotes, la synthèse de l'ADC est effectuée par une enzyme bifonctionnelle GAT-ADCS, enzyme unique portant les fonctions GAT et ADCS, alors que chez la plupart des bactéries, elle est réalisée par deux enzymes distinctes PabA et PabB, PabA étant une GAT et PabB une ADCS. Chez les bactéries on pourrait penser que les gènes *PabA* et *PabB* appartiennent au même opéron et subissent une transcription polycistronique, comme c'est le cas pour les gènes de l'opéron tryptophane. En regardant la position de *PabA* et de *PabB* sur le génome d'*E. coli*, on se rend compte que ces gènes sont très éloignés l'un de l'autre : *PabA* est à 75.18 minute (3488.5 kb) et *PabB* est à 40.80 minute (1892.8 kb) de l'origine de réplication. Il est vraisemblable que ces gènes ne sont pas sur le même opéron, mais cela n'empêche pas qu'ils puissent être co-exprimés de manière similaire. En effet, les deux protéines *PabA* et *PabB* doivent s'associer pour former un hétéro dimère capable de réaliser la synthèse de l'ADC (Nichols et al. 1989) La fusion de ces deux gènes chez les eucaryotes a peut-être permis de remédier à un problème de coordination de l'expression des gènes. De ce point de vue, il est intéressant de noter que l'enzyme fusionnée GAT-ADCS se retrouve aussi chez certains procaryotes appartenant à des familles aussi diverses que des actinobactéries, des α - et γ -protéobactéries et des cyanobactéries. La situation en ce qui concerne la synthèse de l'ADC est donc complexe et ne peut se résumer simplement à :

enzymes monofonctionnelles chez les procaryotes et enzymes bifonctionnelles chez les eucaryotes.

Dans un premier temps nous avons comparé la taille des différents domaines codant les activités GAT et ADCS de quatre modèles eucaryotes avec ceux d'*E. coli*. Le gène d'*Arabidopsis At2g28880* code pour une GAT-ADCS d'environ 103 KDa. Cette protéine possède une séquence d'adressage pour le plaste (figure 1B). Chez *T. gondii*, la protéine bifonctionnelle GAT-ADCS (107 KDa) est codée par le gène *TGME49_002920* tandis que chez *P. falciparum* (116 KDa) elle est codée par le gène *PF11100w* et chez *Saccharomyces cerevisiae* (88 KDa) elle l'est par le gène *EDN62839*.

Dans le tableau 5 nous avons résumé à l'aide du serveur *Pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) la taille des domaines GAT et ADCS de ces 4 espèces.

Tableau 5 : taille des domaines GAT et ADCS de différentes espèces.

	Protéine entière (acides aminés)	Domaine GAT (acides aminés)	Domaine ADCS (acides aminés)
<i>E. coli</i>	499 (GAT + ADCS)	187	312
<i>A. thaliana</i>	917	247 (de 86 à 333)	467 (de 437 à 899)
<i>P. falciparum</i>	979	201 (de 8 à 209)	516 (de 394 à 910)
<i>T. gondii</i>	988	192 (de 34 à 226)	538 (de 431 à 969)
<i>S. cerevisiae</i>	787	208 (de 18 à 226)	489 (de 289 à 778)

L'hétérodimère PabA et PabB d'*E. coli* ne fait que 499 acides aminés, 187 aa pour PabA (21 KDa) et 312 aa pour PabB (36 KDa) alors que les protéines entières des eucaryotes sont environ deux fois plus longues avec plus de 900 acides aminés pour *A. thaliana*, *P. falciparum* et *T. gondii* et environ 800 acides aminés pour *S. cerevisiae*. Cette différence de taille est en partie liée à une séquence d'insertion entre les deux domaines GAT et ADCS de l'enzyme bifonctionnelle (Figure 23).

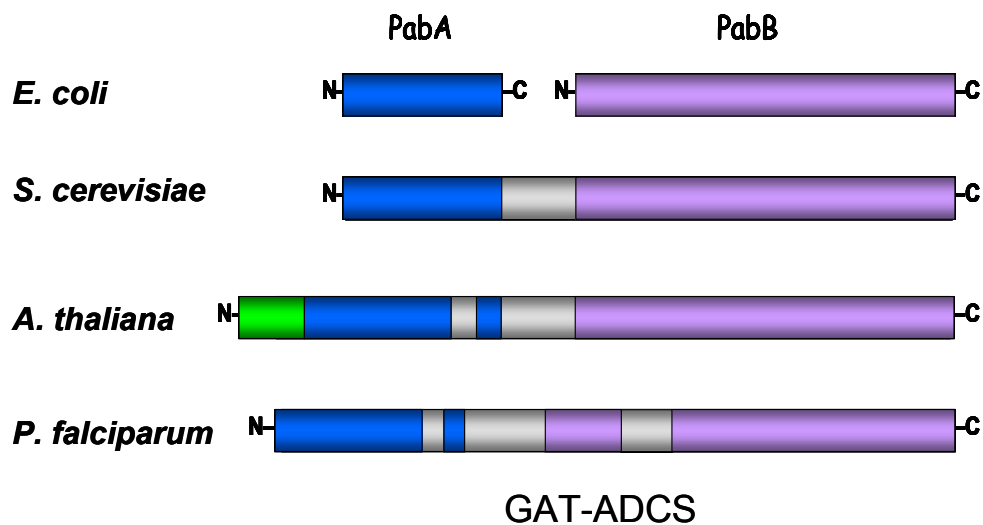


Figure 23 : Comparaison des domaines GAT et ADCS chez différentes espèces. En bleu, le domaine GAT ; en violet, le domaine ADCS ; en vert, l'extension N-terminale chez *Arabidopsis* correspondant au peptide de transit chloroplastique ; en gris, l'insertion d'acides aminés qui relie les domaines GAT et ADCS.

Les domaines GAT des différentes espèces analysées ont sensiblement la même taille, ils varient entre 187 acides aminés pour *E. coli* qui est le plus petit et 247 acides aminés pour *A. thaliana* le plus grand.

Tous les domaines ADCS sont composés de deux parties : une partie C-terminale qui fixe le chorismate et une partie en amont qui ressemble à la région N-terminale du composé I de l'antranilate synthase, une autre enzyme à chorismate. Dans le cas de l'antranilate synthase, cette région est impliquée dans la fixation du tryptophane, un inhibiteur allostérique de l'enzyme. Dans le domaine ADCS de toutes ces espèces, on retrouve systématiquement ces deux parties. La résolution de la structure de la protéine PabB d'*E. coli*, a montré l'existence du site de fixation du tryptophane (Parsons et al. 2002) : le groupe indole du tryptophane (Trp) est logé dans une poche hydrophobe constituée des chaînes latérales des L34, F241 et I394. Ces résidus se retrouvent dans un bloc assez bien conservé chez les enzymes à chorismate étudiées jusqu'à présent. Cependant, aucune des études réalisées avec PabB ne montrent une régulation allostérique de l'activité, et le tryptophane n'a aucun effet sur PabB (Parsons et al. 2002), contrairement à ce qui est observé avec l'antranilate synthase. Chez PabB, le tryptophane est fixé de manière non covalente, mais il ne peut être enlevé qu'en dénaturant la protéine, ce qui suggère que cet acide aminé, étroitement imbriqué dans la structure, est nécessaire au repliement de la protéine. Quoiqu'il en soit, cette ressemblance

entre PabB et le composé I de l'AS suggère qu'il existe un ancêtre commun à ces deux protéines (Crawford 1989). Crawford suppose même que le gène *PabB* serait issu d'une duplication du gène ancestral du composé I de l'AS.

Le tableau 6 nous montre le pourcentage d'identité qui existe entre les différentes GAT-ADCS étudiées. Lorsqu'on compare l'enzyme des eucaryotes à celles d'*E. coli* on constate plus d'homologie entre PabA et les différentes GAT qu'entre PabB et les différentes ADCS, le premier domaine apparaissant donc mieux conservé.

Quand on compare les enzymes entières des eucaryotes entre eux, on remarque que la GAT-ADCS d'*A. thaliana* à une plus forte homologie de séquence avec celle de *T. gondii* (31%) qu'avec les autres protéines qui ont en moyenne 22% d'homologie entre elles.

Tableau 6 : comparaison de séquences des domaines GAT-ADCS de différentes espèces. Pourcentage d'identité entre les protéines.

	<i>A. thaliana</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>T. gondii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
PabA (GAT <i>E. coli</i>)	32%	29%	42%	30%
PabB (ADCS <i>E. coli</i>)	26%	17%	17%	19%
<i>A. thaliana</i> (GAT-ADCS)	-	23%	31%	23%
<i>P. falciparum</i> (GAT-ADCS)	-	-	22%	20%
<i>T. gondii</i> (GAT-ADCS)	-	-	-	21%

Bien que ces homologies de séquence nous donnent des scores qui paraissent un peu faibles, il faut noter qu'il existe des régions bien conservées d'un organisme à l'autre (Figure 24). On retrouve dans le site actif de tous ces domaines GAT trois acides aminés impliqués dans le mécanisme réactionnel, formant une triade catalytique responsable de l'hydrolyse de la glutamine en glutamate : il s'agit d'une Cystéine (C) d'une histidine (H) et d'un glutamate (E). Ces trois acides aminés sont surlignés en jaune. Aussi, les quatre vingt premiers acides aminés de l'AtGAT ne sont pas retrouvés chez les autres espèces car il s'agit du peptide de transit responsable de la localisation plastidiale de l'enzyme chez les plantes.

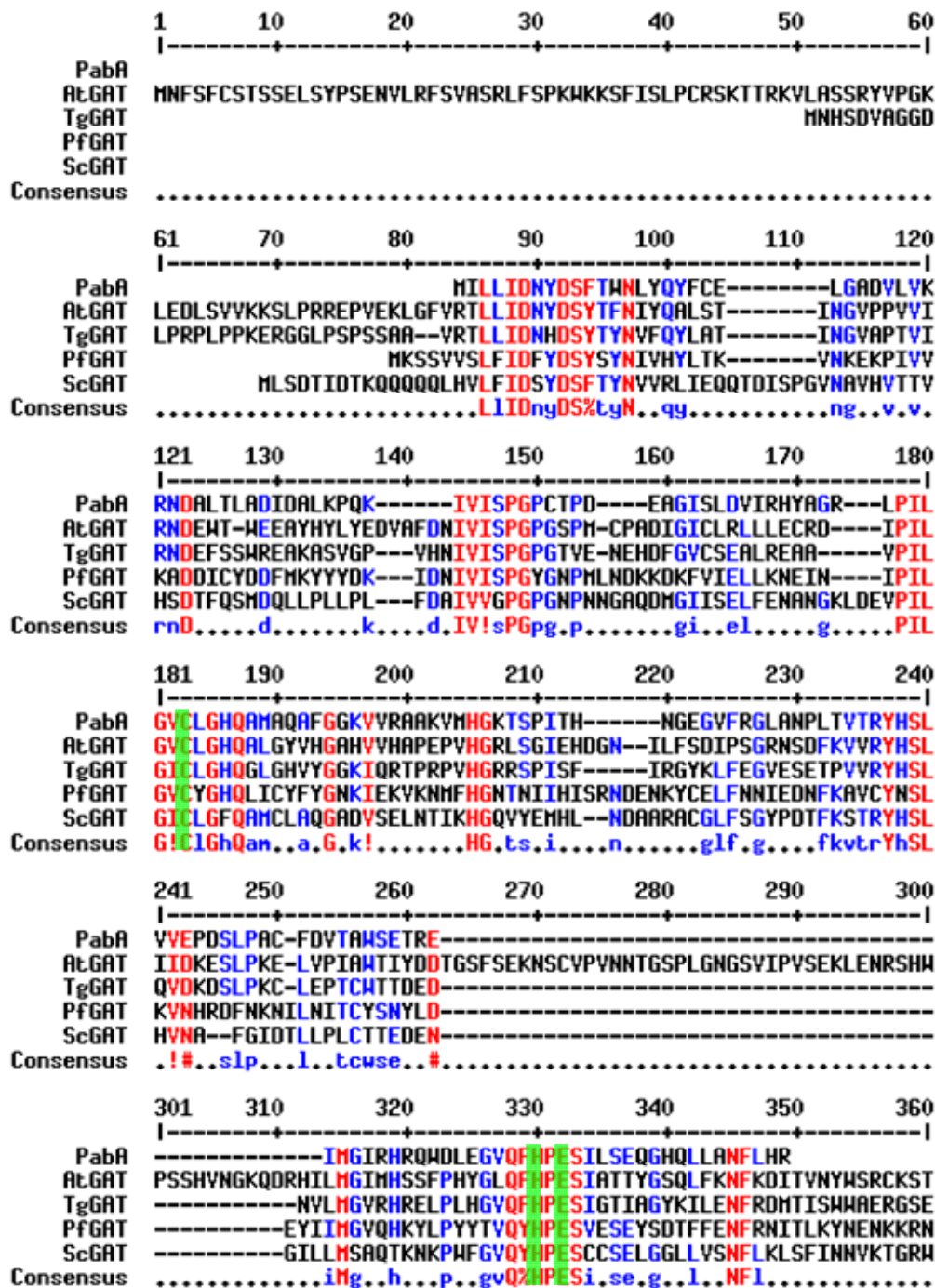


Figure 24 : comparaison de séquences des domaines GAT de *E. coli* (PabA), d'*A. thaliana* (AtGAT), de *T. gondii* (TgGAT), de *S. cerevisiae* (ScGAT) et de *P. falciparum* (PfGAT). En rouge les acides aminés identiques ou fortement similaires et en bleu lorsqu'il y a au moins trois acides aminés identiques sur les cinq. Surlignés en vert les acides aminés du site catalytique.

En ce qui concerne le domaine ADCS, la comparaison des cinq séquences (Figure 25) montre que la région du côté N-terminal est peu conservée. La région N-terminale, possède le site de fixation du tryptophane. Le tryptophane joue un rôle important pour la régulation de l'anthrnilate synthase, mais, comme écrit plus haut dans la partie synthèse bibliographique, son rôle chez les GAT-ADCS n'est pas bien défini. Les tests que nous avons effectués montrent que le tryptophane n'inhibe pas la réaction comme c'est le cas avec l'anthrnilate synthase. Il jouerait plutôt un rôle structurant. En effet, nous avons constaté que lorsque la GAT-ADCS d'*Arabidopsis* est surexprimée en présence de tryptophane, son activité est beaucoup plus stable au cours du temps.

Dans la figure 25, nous avons surligné en rouge les blocs contenant les acides aminés qui interagissent avec le tryptophane : ces acides aminés sont surmontés d'une étoile. On constate que mis à part le premier bloc contenant la Leucine 34 (L34) qui n'est pas conservé, les deux autres blocs se retrouvent dans des zones très conservées. La phénylalanine 241(F241) d'*E. coli* est présente chez *T. gondii* et chez *S. cerevisiae*, par contre elle est remplacée par une tyrosine chez *A. thaliana* et chez *P. falciparum* (ces deux acides aminés sont très similaires). Cette tyrosine se retrouve dans le site de fixation du tryptophane de l'anthrnilate synthase de *Salmonella typhimurium* (Morollo et Eck 2001) dont la structure a été déterminée. L'isoleucine 394 (I394) d'*E. coli* est remplacée par une thréonine chez *Saccharomyces*. La conservation des régions 2 et 3 impliquées dans la reconnaissance du tryptophane chez les enzymes bifonctionnelles GAT-ADCS suggère donc fortement la présence d'un site de fixation d'un acide aminé. Le fait que le bloc 1 (L34) ne soit pas conservé indique que ce site pourrait avoir évolué pour la reconnaissance d'un autre effecteur. Pour le moment, nous n'avons pas pu mettre en évidence un contrôle allostérique par les produits terminaux de la voie.

La région de fixation du chorismate (région C-terminale) présente, au contraire de la région N-terminale, des zones de plus fortes homologues. Toutes les séquences possèdent la séquence consensus PIKGT (surlignée en jaune) où K est responsable de l'attaque nucléophile du C2 du chorismate (se reporter à la synthèse bibliographique). On peut voir aussi dans cette comparaison de séquence (Figure 25) un résidu glutamate très conservé (séquence consensus SPE*F, surlignée en jaune) où E est nécessaire pour le clivage du groupe hydroxyle du C4 du chorismate.

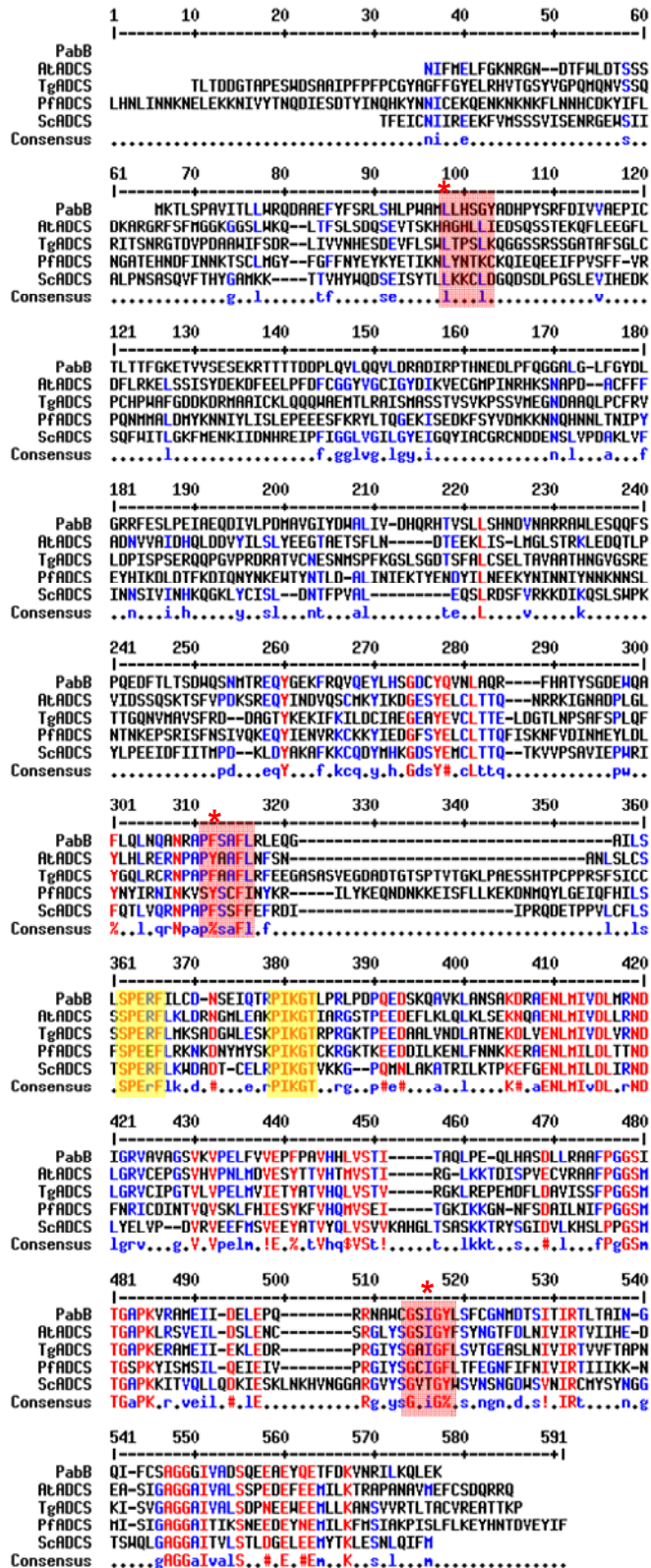


Figure 25 : comparaison de séquences des domaines ADCS d'*E. coli* (PabB), de *A. thaliana* (AtADCS), de *T. gondii* (TgADCS), de *S. cerevisiae* (ScADCS) et de *P. falciparum* (PfADCS). En rouge les acides aminés identiques ou fortement similaires, en bleu les acides aminés similaires. Surlignée en rouge, la zone où se trouvent les acides aminés qui pourraient fixer la partie indole du tryptophane. Surlignés en jaune les acides aminés du site catalytique.

Nous avons vu dans la partie bibliographique que, suivant les espèces, le mécanisme réactionnel des PabB pouvait être différent selon la présence ou non d'une lysine dans la séquence consensus PIKGT. En effet, chez *B. subtilis*, cette séquence est PIAGT, et, dans ce cas, l'attaque nucléophile sur le C2 du chorismate est effectuée par un NH₃ provenant d'une deuxième glutamine et non par un résidu de la protéine. Nous avons voulu vérifier si cette diversité réactionnelle existait aussi chez les enzymes bifonctionnelles GAT-ADCS. Nous avons comparé plusieurs séquences de GAT-ADCS représentatives des plantes, champignons, apicomplexes et bactéries (Figure 26). Dans tous les cas nous avons retrouvé la séquence consensus PIKGT (sauf chez *Aspergillus* où cette séquence est PMKGT) ce qui semble indiquer que la plupart sinon toutes les GAT-ADCS présentent un mécanisme réactionnel similaire à celui de PabB d'*E. coli*.

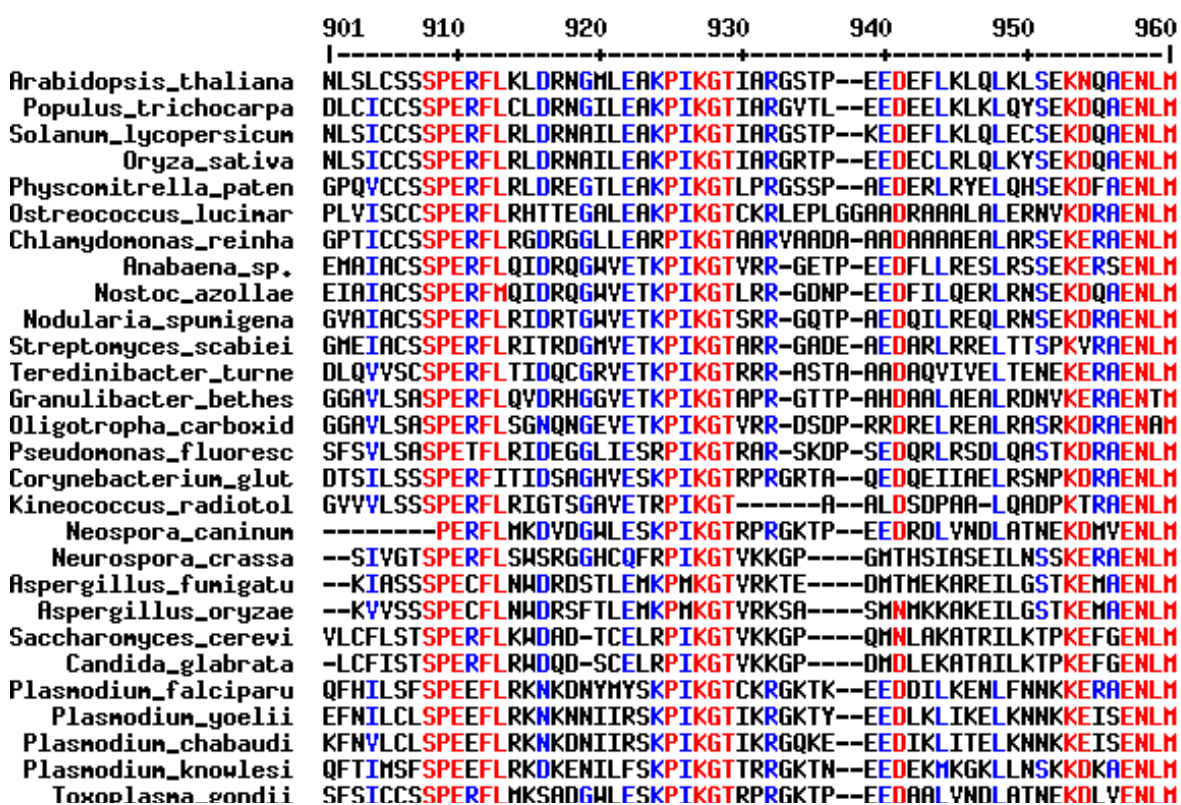


Figure 26 : Alignement de séquences de protéines bifonctionnelles GAT-ADCS. Dans le domaine ADCS la séquence conservée PI (M) KGT est impliquée dans l'attaque nucléophile du C2 du chorismate. Les séquences autour de cette région conservée correspondant à 30 organismes différents représentant les plantes, les Apicomplexes, les champignons et les bactéries ont été alignées en utilisant un programme d'alignement multiple.

B. Arbre phylogénétique des ADC synthase (GAT-ADCS)

Nous avons construit l'arbre phylogénétique des GAT-ADCS en utilisant les séquences protéiques des espèces disponibles dans les différentes bases de données (figure 27). La méthode algorithmique d'alignement utilisée est celle de CLUSTALW et le calcul de l'arbre a été fait selon la méthode du maximum de vraisemblance mise au point par Ronald Fisher vers 1922 (Norton et Pearson 1976). Cette méthode de reconstruction phylogénique évalue l'ordre probable des branchements et la longueur des branches d'un arbre pour un modèle évolutif donnée. Une fois l'arbre phylogénique établie, nous avons évalué par 'bootstrap' la confiance que l'on peut avoir en cet arbre : cette méthode, sans doute la plus utilisée en phylogénie, part du postulat que les caractères évoluent de manière indépendante. Elle a été proposée pour la première fois par Bradley Efron en 1979 (Efron et Tibshirani 1994). Cette méthode peut être décrite de la façon suivante :

- Un arbre T est obtenu à la suite d'un alignement des séquences d'origine (de longueur n, n étant le nombre de résidus). Cet alignement définit donc n colonnes
- A partir de cet alignement, on combine de façon aléatoire les n colonnes de l'alignement d'origine (tirage avec remise, c'est-à-dire que la même colonne peut apparaître plusieurs fois dans la combinaison aléatoire) et obtention d'un nouvel alignement A'.
- Estimation du sous arbre obtenu T' à partir de l'alignement A'.
- L'opération est répétée 100 fois
- Comparaison des arbres T et T' : pour chaque sous arbre T', on regarde s'il est présent dans T.

On compte ensuite pour chaque sous arbre le nombre de fois où il est présent dans T. Cette fréquence avec laquelle on retrouve un sous-arbre est la valeur de bootstrap (plus elle est élevée, plus la fiabilité de la branche est importante). Il est important de noter que ce qui est réalisé ici (avec le bootstrap) est la vérification de la qualité de l'alignement.

Comme le montre la Figure 27, les GAT-ADCS de plantes (supérieures et inférieures) forment un bloc compact, illustrant ainsi qu'elles ont bien toutes la même origine. Il est intéressant de constater que le groupe des plantes est proche d'un petit groupe de bactéries qui inclut les cyanobactéries et d'une branche contenant deux apicomplexes appartenant aux genres *Toxoplasma* et *Neospora*. Par contre il est étonnant que la branche contenant le genre *Plasmodium* soit éloignée de celle contenant les autres apicomplexes. Cela est peut-être lié au biais qui existe dans le génome de ces organismes, particulièrement riche en A et T (82 % de

A et T chez *P. falciparum*), et qui se traduit au niveau des protéines par des séquences riches en résidus N, K, I L, E, et D (ces six acides aminés représentant 51 % du total des acides aminés des protéines chez *P. falciparum* (Bastien et al. 2004).

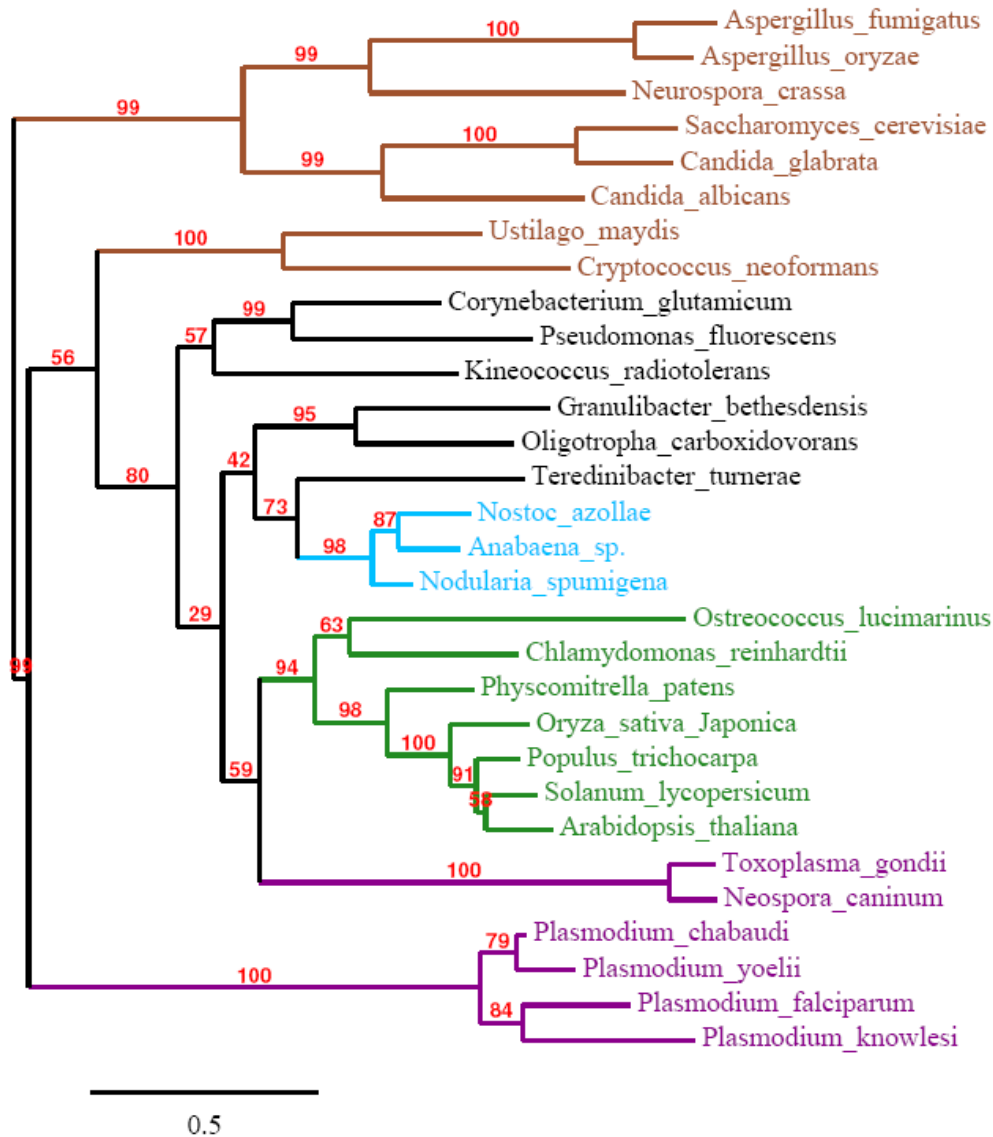


Figure 27 : Arbre phylogénétique des GAT-ADCS. L'arbre a été construit en utilisant la méthode de comparaison du programme de phylogénie PhyML et la procédure de bootstrapping (nombre de bootstrap : 100) disponibles sur le site <http://www.phylogeny.fr/>. Les espèces appartenant au groupe des champignons sont colorées en marron, aux procaryotes en noirs, avec en bleu une distinction particulière pour les cyanobactéries, aux plantes en vert et aux apicomplexes en violet.

II. Surproduction des GAT-ADCS recombinantes

A. Surproduction de la GAT-ADCS de *P. falciparum*

Sur le site *plasmoDB* (<http://plasmodb.org/plasmo/>) le gène de la GAT-ADCS a été identifié et annoté, il s'agit du gène *PF11100w*. A l'aide du logiciel en ligne *Globplot* (<http://globplot.embl.de/>) qui permet de prédire les domaines globulaires stables et les régions désordonnées d'une protéine, nous avons prédit que la séquence protéique de PfGAT-ADCS n'est pas désordonnée et qu'elle possède deux grands domaines globulaires correspondant aux domaines GAT et ADCS. Les logiciels dédiés ne prédisent pas non plus de séquence d'adressage vers un compartiment cellulaire spécifique. L'ensemble de ces prédictions nous ont décidés à cloner l'intégralité du gène concerné. A partir d'une banque d'ADNc de *P. falciparum* nous avons amplifié par PCR, puis cloné dans le plasmide Pet28b⁺ le gène *PF11100w*. La taille attendue du gène *PF11100w* est de 2940 pb, et nous avons vérifié par séquençage la qualité du clonage effectué. Compte tenu du biais existant dans le génome de cet organisme, nous avons aussi fait construire un gène de synthèse, optimisé pour l'usage des codons d'*E. coli*.

La surexpression de la PfGAT-ADCS a été faite dans *E. coli* (souche BL21). Malheureusement, nous n'avons jamais pu produire la protéine que se soit avec le gène de synthèse où le gène obtenu à partir de la banque d'ADNc. Cela est peut être lié à l'instabilité de la protéine, ou au fait que la protéine est produite mais que la bactérie la détruit au fur et à mesure de la traduction. A ce stade, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses. Nous n'avons pas eu le temps d'entreprendre une transcription et une traduction *in vitro*, approche qui aurait peut-être pu nous permettre de comprendre où se situe le problème d'expression : au niveau de la transcription en ARN messenger ou au niveau de la traduction en protéine.

B. Surproduction de la GAT-ADCS de *T. gondii*

Nous avons effectué les mêmes approches *in silico* avec la GAT-ADCS de *T. gondii* (TgGAT-ADCS). L'analyse par *Globplot* de la TgGAT-ADCS indique une protéine très instable, avec de nombreuses régions désordonnées (dont les 100 premiers acides aminés). Par ailleurs, nous avons noté qu'il existait chez *T. gondii* une trentaine de résidus en amont de la zone conservée (base de données *ToxoDB*. <http://toxodb.org/toxo/>). Ces trente résidus ne sont apparemment pas impliqués dans l'adressage de l'enzyme dans un compartiment intracellulaire particulier. Lorsque nous avons voulu amplifier le gène par RT-PCR, nous

n'avons jamais réussi à obtenir un amplicon complet, par contre nous avons pu amplifier un fragment qui débutait cinq acides aminés avant la zone conservé (25 acides aminés après le début de la séquence prédite sur *ToxoDB*). La séquence de TgGAT-ADCS que nous avons obtenu étant différente de celle annotée sur *ToxoDB*, nous avons conclu de ce travail que la séquence proposée dans la base de données était sans doute erronée. Il y a eu divers remaniement de la base de données *ToxoDB* au cours des 3 années de mon travail, et la séquence du gène *TGME49_002920* a changé à plusieurs reprises. Aujourd'hui la dernière annotation du gène dans la base *ToxoDB* montre que la séquence codante prédite correspond à la séquence que j'avais amplifiée.

Le clonage a été réalisé dans le plasmide pet28b⁺ qui a servi à transformer la souche BL21 de *E. coli*. La croissance des bactéries est faite dans le milieu M9 avec 0.2% (p/v) de glucose, et à 17° C comme pour l'AtGAT-ADCS. Nous avons réussi à produire la protéine, mais celle-ci était essentiellement présente sous la forme de corps d'inclusion (figure 28).

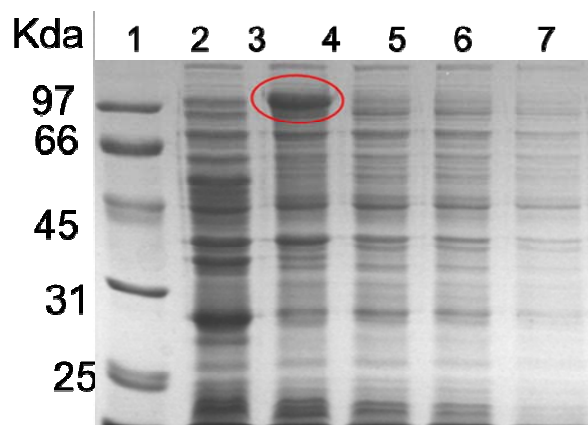


Figure 28 : Purification sur colonne Ni-Sepharose HP ® de la GAT-ADCS de *T. gondii*. Puits 1 : marqueur de taille, puits 2 : sans IPTG, puits 3 : protéines totales, puits 4 : protéines solubles, puits 5 : protéines passées à travers la colonne, puits 6: lavage avec 50 mM d'imidazole, puits 7 : élution avec 200 mM d'imidazole.

L'insolubilité peut être due à un mauvais repliement de la protéine qui s'agrège alors. Pour la solubiliser, nous avons dénaturé la protéine en présence d'urée 8M, puis purifié celle-ci par passage sur une colonne de Ni-Sepharose HP ®, toujours en présence d'urée 8 M (figure 29).

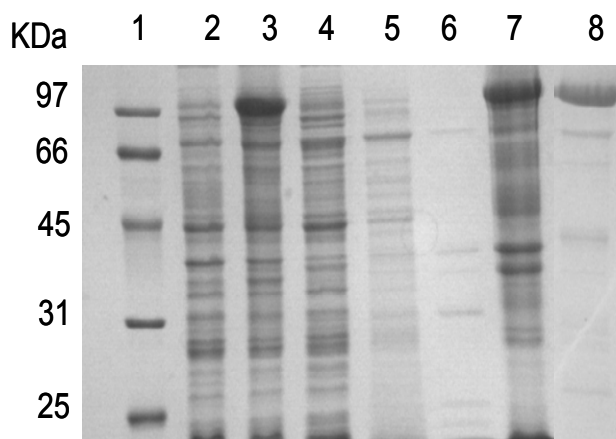


Figure 29 : Purification de la GAT-ADCS de *T. gondii* en condition dénaturante. Puits 1 : marqueur de taille, puits 2 : sans IPTG, puits 3 : protéines totales, puits 4 protéines solubles après centrifugation, puits 5 : protéines solubles après lavage du culot au triton x100 1%, puits 6: protéines solubles après 2^{ème} lavage du culot au Triton x100 1%, puits 7 : protéines solubles après lavage du culot à l'urée 8 M, puits 8 : protéines purifiées sur colonne de Ni-Sepharose HP ® en condition dénaturante.

Après le passage sur la colonne de Ni-Sepharose HP ®, nous avons récupéré une protéine partiellement purifiée que nous avons tenté de renaturer par dialyse contre du tampon Tris/HCl 100 mM pH8, glycérol 10% (v/v). La majeure partie de la protéine a précipité suite à la renaturation, et nous n'avons pu en récupérer qu'une infime partie (environ 1%) sous une forme soluble, sur laquelle nous avons effectué un dosage d'activité.

Le dosage de l'activité de la GAT-ADCS peut se faire par couplage avec une autre enzyme, la glutamate déshydrogénase (GDH) (voir le chapitre Matériel et Méthodes). En présence de glutamine, la GAT-ADCS transforme le chorismate en aminodeoxychorismate (ADC) et glutamate, et la GDH transforme le glutamate en α -cetoglutarate en présence de NAD, ce dernier étant alors réduit en NADH (figure 30). On peut observer au spectrophotomètre à 340 nm la formation du NADH qui est fonction de la quantité de glutamine utilisée par la GAT-ADCS.

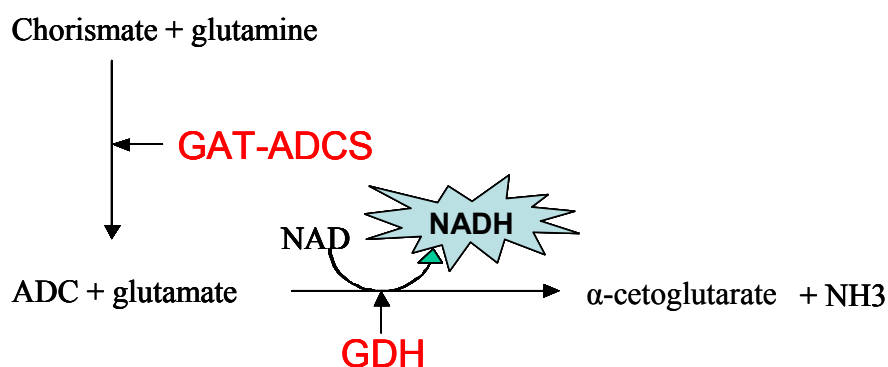


Figure 30 : couplage des réactions catalysées par le domaine GAT de la GAT-ADCS avec celle de la GDH.

Nous avons obtenu une activité assez faible, la vitesse maximale étant d'environ 90 nmol/min/mg de protéine (figure 31).

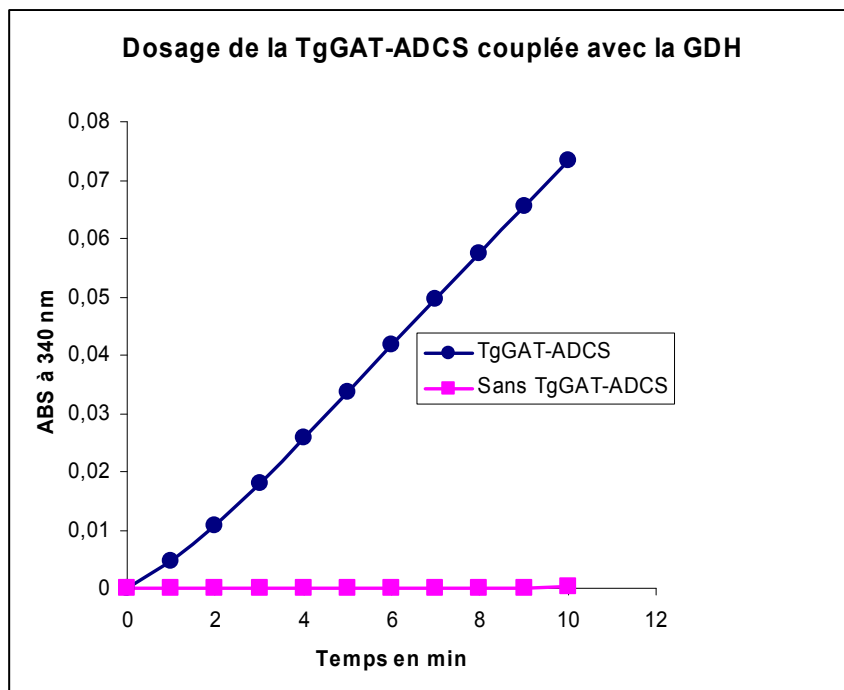


Figure 31 : dosage du domaine GAT de la TgGAT-ADCS au spectrophotomètre à 340 nm. Volume réactionnel 500 μ l ; TgGAT-ADCS 20 μ g/ml, GDH 50 μ g/ml, glutamine 500 μ M chorismate 200 μ M, NAD 1 mM.

Ce dosage a donc permis de confirmer l'identité du gène *TGME49_002920* cloné , mais la quantité de protéine obtenue (une dizaine de microgrammes seulement) et la grande instabilité de l'enzyme renaturée ne nous ont pas permis d'aller plus loin dans l'étude de cette GAT-ADCS.

C. Surproduction de la GAT-ADCS d'*A. thaliana*

1. Surexpression dans un système d'expression bactérienne

Dans un premier temps nous avons voulu réaliser le clonage du gène de la GAT-ADCS d'*A. thaliana* (AtGAT-ADCS) sans les quatre-vingt premiers acides aminés car, en se basant sur l'alignement de séquence avec PabB d'*E. coli*, ces acides aminés pourraient correspondre au peptide de transit. Nous nous sommes rendu compte que la protéine produite était active mais peu stable au cours du temps. En analysant la séquence en acides aminés de l'AtGAT-ADCS avec le logiciel *Globplot*, nous avons constaté que la suppression des 80

premiers acides aminés conduit à une protéine prédite comme désordonnée au niveau du domaine GAT. En ne supprimant que 43 acides aminés, le logiciel *Globplot* prédit une protéine avec un domaine globulaire supplémentaire dans la région N-terminale, donc *a priori* plus stable. Le logiciel d'identification des peptides de transit *Target P* nous prédisait quant à lui une séquence d'adressage d'une quarantaine d'acides aminés. Nous avons donc produit et comparé les deux formes de l'AtGAT-ADCS : la forme longue (protéine native moins les 43 acides aminés) et la forme courte (protéine native moins les 80 acides aminés).

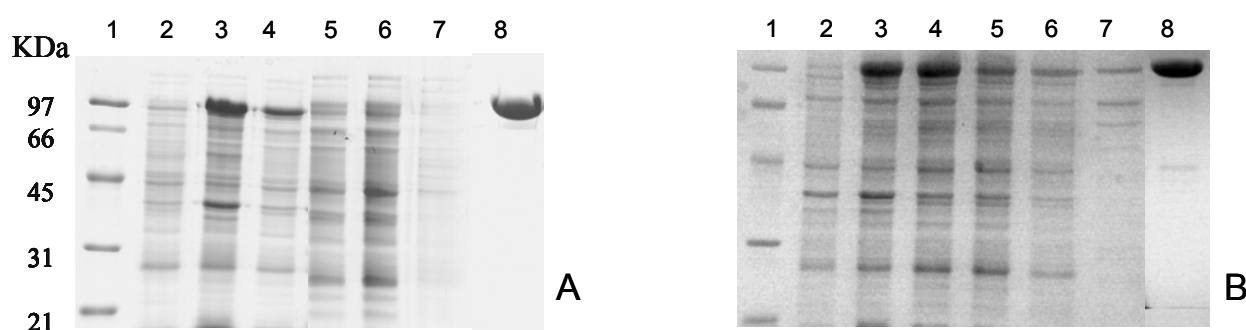


Figure 32 : Purification sur colonne de Ni-Sepharose des deux formes d'AtGAT-ADCS. En A forme courte et en B forme longue. Puits 1 : marqueur de taille, puits 2 : sans IPTG, puits 3 : protéines totales, puits 4 : protéines solubles, puits 5 : protéines passées à travers la colonne, puits 6 : lavage avec 15 mM d'imidazole, puits 7 : lavage avec 50 mM d'imidazole, puits 8 : élution avec 200 mM d'imidazole.

Les deux protéines sont très bien exprimées dans *E. coli*, par contre nous avons constaté que la forme longue est totalement soluble alors que la forme courte ne l'est que partiellement (figure 32) : pour 1 litre de culture nous obtenons avec la forme courte 2.5 mg de AtGAT-ADCS purifiée, alors qu'avec la forme longue le rendement est environ quatre fois supérieur, soit 10 mg de protéine pour 1 litre de culture.

2. Etude de la stabilité par thermo-fluorescence des formes courte et longue de la GAT-ADCS d'*A. thaliana*

Nous avons effectué un test de « Thermo-fluorescence » pour vérifier la stabilité de ces enzymes. Ce test se fait en faisant varier le pH et la température en présence ou non de différents ligands. Pour cela nous mettons la protéine en présence de Sypro orange, une molécule fluorescente qui a la particularité de se fixer sur les régions hydrophobes de la protéine et d'émettre à une longueur d'onde de 600 nm (excitation 300 nm). Pour que ces régions hydrophobes soient accessibles, il faut que la protéine soit mal repliée ou dénaturée.

En augmentant la température dans l'échantillon de protéine, on peut voir à quelle température la fluorescence augmente et donc à quelle température la protéine se déstructure. On peut ainsi calculer la température de fusion (T_m) de chaque protéine selon le tampon d'incubation. La figure 33 nous montre le résultat obtenu avec les deux formes de l'AtGAT-ADCS pour différents pH.

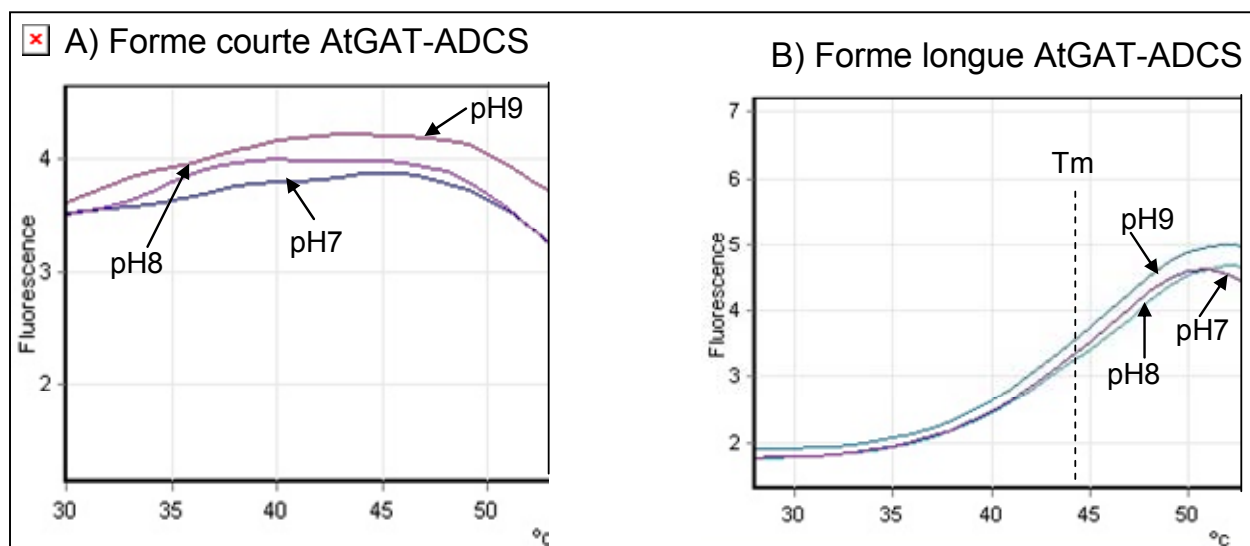


Figure 33 : Test de thermo-fluorescence des deux formes de l'AtGAT-ADCS à pH 7.0, 8.0 et 9.0.

En abscisse nous avons la température et en ordonnée une valeur arbitraire pour la fluorescence. On constate que lorsque le pH est compris entre 7 et 9 on n'a aucune réelle différence sur la stabilité de la protéine donnée. La forme longue de l'AtGAT-ADCS (figure 33b) a l'allure idéale d'une courbe qu'on obtient en réalisant un test de thermo-fluorescence. On a une fluorescence de départ autour de 2 puis en augmentant la température cette fluorescence reste stable jusqu'à 38 °C avant d'augmenter assez rapidement. La protéine se dénature et fixe le Sypro orange à des températures supérieures à 38 °C. On peut déterminer un T_m (point d'inflexion de la courbe) qui est ici d'environ 45 °C, quel que soit le pH.

Pour ce qui est de la forme courte de l'AtGAT-ADCS (figure 33a), on constate que dès le départ nous avons une fluorescence élevée autour de 3.5. En augmentant la température, cette fluorescence varie peu. Apparemment la protéine est partiellement dénaturée, et le Sypro orange a donc accès aux zones hydrophobes dès le départ. Avec la forme courte on ne peut pas déterminer le T_m .

Les tests de stabilité par thermo-fluorescence montrent donc que la forme longue de l'AtGAT-ADCS semble mieux repliée que la forme courte.

3. Etude de la stabilité au cours du temps par dosage des activités des formes courte et longue de la GAT-ADCS d'*A. thaliana*

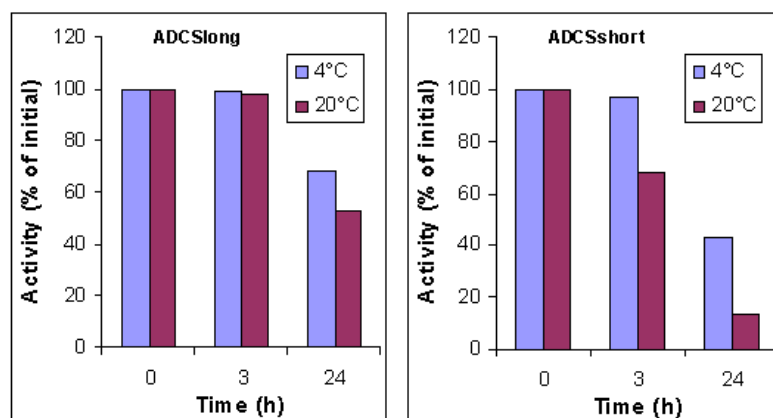


Figure 34 : stabilité de l'AtGAT-ADCS au cours du temps à 20 °C et à 4 °C

Pour tester la stabilité de l'activité GAT-ADCS, nous incubons les deux formes d'enzymes pendant un temps donné à différentes températures avant de doser leur activité. Le dosage de ces activités (activités estimées en couplant l'activité GAT de la GAT-ADCS et la GDH) est indiqué sur les graphes de la figure 34. On peut voir que la forme longue de l'AtGAT-ADCS a une activité GAT plus stable au cours du temps par rapport à la forme courte, l'instabilité augmentant avec la température. Après 3 h à 20 °C, la forme longue a une activité qui est identique à celle de départ, tandis que la forme courte perd 30 % de son activité. Après 24 h à 20 °C, la forme courte perd 90 % de son activité alors que la forme longue ne perd que 45 % de son activité.

4. Discussion

Les essais de production et de purification des GAT-ADCS issues de *T. gondii* et *P. falciparum* n'ont pas été concluants.

Dans le cas de la PfGAT-ADCS plusieurs méthodes ont été utilisées afin de produire la protéine chez *E. coli*, mais sans succès. Nous avons testé plusieurs milieux : le milieu minimum M9 (comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes) ; le milieu LB qui est un

milieu riche ; le milieu LB en présence de sorbitol 0.6 M et de bétaine 2,5 mM (le sorbitol augmente la pression osmotique et favorise l'entrée de la bétaine dans la bactérie ; la bétaine est un osmoprotecteur et agit comme une chaperone chimique, en facilitant le repliement et en augmentant la stabilité des protéines) ; le milieu LB associé à des chocs thermiques (cette technique consiste à changer brutalement la température de culture de 17 °C à 42 °C afin d'induire dans la bactérie la production de Heat Shock Protein, qui sont des protéines chaperones). Après toutes ces tentatives, notre hypothèse est que la protéine n'est probablement pas produite. Cela peut être lié aux taux élevés de certains acides aminés. En effet, cette protéine possède 125 asparagines (13 % des résidus) et 105 lysines (11 % des résidus), alors qu'habituellement ces résidus ne représentent que 4 % et 5 % des acides aminés constitutifs des protéines d'origine procaryotique (Clarke et Clark 2008).

Dans le cas de la TgGAT-ADCS la protéine a pu être surexprimée dans *E. coli*, mais celle-ci n'était pas soluble. Nos différentes tentatives pour solubiliser cette enzyme ont échouées. Nous avons en plus tenté de produire la protéine dans le système bactérien *Lactococcus lactis*. Utilisé couramment au laboratoire pour produire les protéines membranaire, *L. lactis* ne forme pas de corps d'inclusion, toutes les protéines produites étant solubles. Nous n'avons obtenu aucune expression de la TgGAT-ADCS dans *L. lactis*. Seule la dénaturation en présence d'urée 8 M, suivie de l'élimination progressive de l'urée par des techniques de dialyse nous a permis d'obtenir un peu de protéine soluble et active. Les quantités purifiées ne nous ont cependant pas permis pour le moment de faire une étude biochimique complète.

Nous avons réussi à produire deux formes de la GAT-ADCS d'*A. thaliana*. Une forme courte et une forme plus longue d'une quarantaine d'acides aminés en N-terminal. Nous avons constaté que la forme longue était beaucoup plus stable que la forme courte. De plus, le rendement de purification de la forme longue est 4 fois supérieur à celui de la forme courte.

Nous avons donc décidé de réaliser une étude biochimique de la forme longue GAT-ADCS d'*Arabidopsis*, qui nous servira de modèle de GAT-ADCS. En effet, l'étude *in silico* des GAT-ADCS de *A. thaliana*, de *T. gondii* et de *P. falciparum* nous a permis de mettre en évidence des séquences très conservées entre les différents domaines de ces trois enzymes, suggérant des mécanismes réactionnels semblables : la présence dans le site actif des domaines GAT de trois acides aminés impliqués dans le mécanisme réactionnel, formant une triade catalytique responsable de l'hydrolyse de la glutamine en glutamate et NH₃, et, dans le domaine ADCS, la séquence consensus PIKGT associée à l'attaque nucléophile du C2 du chorismate. De plus l'étude phylogénique montre un regroupement entre les GAT-ADCS de

plantes et celles des apicomplexes (surtout en ce qui concerne *T. gondii* et *Neospora caninum*) et nous conforte dans l'idée d'utiliser l'enzyme de plante comme modèle de GAT-ADCS pour ces différents organismes.

III. Propriétés cinétiques de la GAT-ADCS d'*A.thaliana*

Nous avons cherché à compléter les données cinétiques précédemment obtenues avec la GAT-ADCS (forme courte) d'*A. thaliana* (Sahr et al. 2006b). En effet, cette première version de l'enzyme recombinante n'était produite qu'en faible quantité et présentait une grande instabilité dans le temps. Au cours de cette première étude l'activité du domaine ADCS avait été peu étudiée. De même, le couplage entre les activités GAT et ADCS ou le couplage entre les activités GAT-ADCS et ADCL n'avaient pas été abordés. Disposant à présent d'une enzyme plus stable et produite en grande quantité, nous avons pu envisager d'autres types d'expériences. Par exemple, nous avons pu utiliser une approche de ^{15}N -RMN (technique peu sensible qui exige de grandes quantités de protéine) pour mesurer simultanément à un instant donné les quantités de produits et substrats présents dans le milieu réactionnel.

Les données cinétiques de la GAT-ADCS peuvent être influencées par la présence d'ADCL qui évite que l'ADC, produit final de la réaction catalysée par la GAT-ADCS, ne s'accumule. Nous avons donc cherché à surexprimer l'ADCL d'*Arabidopsis* dont le gène a été identifié il y a quelques années (Basset et al. 2004d). Malheureusement, toutes nos tentatives pour obtenir de l'enzyme recombinante active ont échoué. La protéine était bien exprimée, soluble et en quantité importante, mais non fonctionnelle. Nous avons donc alors cloné et surexprimé l'enzyme PabC d'*E. coli* (EcADCL). L'enzyme recombinante a pu être produite active et en grande quantité. Le couplage des activités GAT-ADCS et ADCL a donc été étudié à l'aide d'un système hétérologue, AtGAT-ADCS et EcADCL.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans Archives of Biochemistry and Biophysics (Camara et al.2011) et sont décrits dans les pages suivantes.



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

The synthesis of pABA: Coupling between the glutamine amidotransferase and aminodeoxychorismate synthase domains of the bifunctional aminodeoxychorismate synthase from *Arabidopsis thaliana*

Djeneb Camara¹, Céline Richefeu-Contesto¹, Bernadette Gambonnet, Renaud Dumas, Fabrice Rébeillé*

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, UMR5168 CNRS-CEA-INRA-Université Joseph Fourier Grenoble I, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 17 September 2010

Key words:
Folate
Vitamins
C1 metabolism
Chorismate
Aminodeoxychorismate biosynthesis
p-Aminobenzoate biosynthesis

ABSTRACT

Aminodeoxychorismate (ADC) synthase in plants is a bifunctional enzyme containing glutamine amidotransferase (GAT) and ADC synthase (ADCS) domains. The GAT domain releases NH_3 from glutamine and the ADCS domain uses NH_3 to aminate chorismate. This enzyme is involved in folate (vitamin B9) biosynthesis. We produced a stable recombinant GAT-ADCS from *Arabidopsis*. Its kinetic properties were characterized, and activities and coupling of the two domains assessed. Both domains could operate independently, but not at their optimal capacities. When coupled, the activity of one domain modified the catalytic properties of the other. The GAT activity increased in the presence of chorismate, an activation process that probably involved conformational changes. The ADCS catalytic efficiency was 10⁴ fold higher with glutamine than with NH_4Cl , indicating that NH_3 released from glutamine and used for ADC synthesis did not equilibrate with the external medium. We observed that the GAT activity was always higher than that of ADCS, the excess of NH_3 being released in the external medium. In addition, we observed that ADC accumulation retro-inhibited ADCS activity. Altogether, these results indicate that channeling of NH_3 between the two domains and/or amination of chorismate are the limiting step of the whole process, and that ADC cannot accumulate.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Folates are a family of cofactors that are essential for all cellular one-carbon transfer reactions. They are involved in several metabolic pathways, all of prime importance, such as the synthesis of purines, thymidylate, pantothenate, methionine and the interconversion of serine and glycine [1,2]. Folate cofactors are made of three distinct parts: a pterin ring, a p-aminobenzoate (pABA)² moiety, and a glutamate residue, to which is usually attached a γ -linked polyglutamyl tail of up to about six residues [3]. These cofactors belong to the group of B vitamins (vitamin B9) and their biosynthesis is a matter of concern for at least two reasons. First, folate deficiency in humans is a worldwide health problem and because plant foods are a major source of folate, it is important to understand how these cofactors are synthesized

to develop strategies aimed to enhance folate content in plants [4–6]. Second, the biosynthesis of folate derivatives is a target of choice for antibiotics, anti-parasites and herbicides. Up to now, the antifolates that have been developed and used in therapy target only two enzymes of the pathway, namely dihydropteroate synthase (targeted by pABA analogs, such as sulfonamide compounds), and dihydrofolate reductase (targeted by pteridin analogs, such as methotrexate and trimethoprim). However, the increasing resistance seen in both bacterial and eukaryotic pathogens, including the apicomplexans *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* [7], requires the identification of new targets.

Among the potential targets, the enzymes involved in the pABA branch of the folate pathway are of great interest. Indeed, the only known metabolic fate of pABA is its commitment in folate synthesis and it was recently shown that the production of pABA in plants, together with the production of pterins, is rate limiting for the whole folate pathway [6,8]. pABA is synthesized from chorismate, a metabolite also involved in p-hydroxybenzoate and aromatic amino acid synthesis [9–11]. As shown in Fig. 1A, the first step is the amination of chorismate to form 4-amino-4-deoxychorismate (ADC). In a second step, ADC is aromatized with loss of pyruvate to form pABA.

* Corresponding author. Fax: +33 (0) 4 38 78 50 91.

E-mail address: frebeille@cea.fr (F. Rébeillé).

¹ D.C. and C.R.-C. contributed equally to this work.

² Abbreviations used: ADC, 4-amino-4-deoxychorismate; ADCS, ADC synthase; ADCL, ADC lyase; GAT, glutamine amidotransferase; AtADCS, *Arabidopsis thaliana* ADC synthase; EcADCL, *Escherichia coli* ADCL; pABA, p-Aminobenzoate; PLP, pyridoxal phosphate.

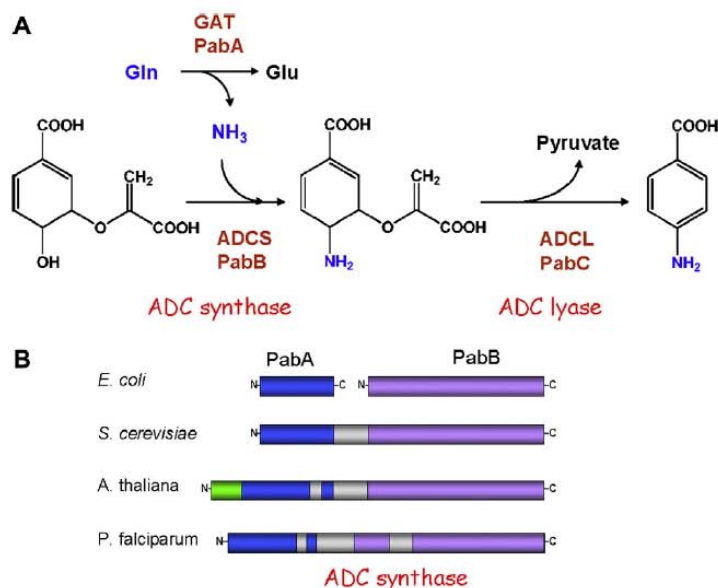


Fig. 1. The two steps synthesis of pABA from chorismate. (A) The first step is catalyzed by PabA and PabB in *E. coli* and by ADCS in eukaryotic organisms. This first step involved two reactions: a GAT activity to provide the NH_3 moiety, and an ADCS activity for the replacement of the hydroxyl group at the C4 position of chorismate by NH_3 . (B) Representation of the ADCS from various organisms, illustrating the bi-functionality found in eukaryotes. Note that the plant enzyme has an additional N-terminal extension corresponding to a plastidial transit peptide (green). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

In bacteria such as *Escherichia coli* or *Bacillus subtilis*, this biosynthesis requires three separate proteins: PabA (the GAT), PabB (the ADCS), and PabC (the ADCL). Thus, the synthesis of ADC in bacteria requires the cooperation of two proteins, PabA and PabB forming a heterodimeric complex [12]. While PabA alone has no GAT activity [12], PabB alone can convert chorismate to ADC in the presence of ammonia [13]. The mechanism used for ADC synthesis is common to three other chorismate-utilizing enzymes, salicylate synthase, isochorismate synthase and anthranilate synthase [14–17]. It involves the formation of an intermediate generated by addition of a nucleophile to C2 of chorismate and elimination of the C4 hydroxyl group [18,19]. In *E. coli* PabB, the nucleophile is the K274 residue, whereas in *B. subtilis* it is free NH_3 provided by PabA, forming in this last situation an aminodeoxyisochorismate intermediate, as for anthranilate synthase [20]. In this last case, two NH_3 (and thus two glutamines) are therefore required for the formation of ADC, one for the nucleophilic attack of the chorismate ring, and one for its amination. Based on this mechanism, strategies have been developed to irreversibly inhibit PabB activity by chorismate analogs [21] such as 2-fluorochorismate [22]. Although the mechanism of ADC synthesis is now rather well understood, the way the two activities, GAT and ADCS, are coordinated is less clear. By comparison with the carbamoyl phosphate synthetase, an other class I aminotransferase enzyme, it is possible that NH_3 is channeled between the two domains [23,24], a hypothesis reinforced by the high K_m value (representative of a low affinity) recorded for NH_3 [25]. Also, there is to date no evidence for any regulation of pABA synthesis. Indeed, neither PabA or PabB activities have been shown to be feedback controlled by the end products of their reactions, or by products of folate metabolism [26].

In eukaryotes, the situation appears different. Indeed, in plants and lower eukaryotes such as yeast and apicomplexa,

the synthesis of ADC is catalyzed by a single protein (Fig. 1B) containing the two domains, GAT in the N-terminal part and ADCS in the C-terminal part [27,28]. Only the plant enzyme activity has been partially characterized [29]. It is a monomeric protein located in plastids, together with the ADCL, making this organelle the unique site of pABA synthesis in plants [27,30]. Preliminary studies with the plant recombinant protein confirmed the bifunctional nature predicted by genomic analyses [29]. However, the low expression of the enzyme in *E. coli* and its instability prevented detailed examination of the activities and coupling of the two domains. In particular, the catalytic properties of the ADCS domain were not examined. To further understand the kinetic mechanisms operating in this class of enzymes, we produced at high yield a stable recombinant plant GAT-ADCS, and we characterized in details some of its properties, estimating the activities, limiting steps and coupling of the two domains through various methods of measurement. Also, we investigated for the first time the impact of ADCL upon the GAT and ADCS activities.

Materials and methods

Expression of the recombinant AtADCS in *E. coli*

Arabidopsis cDNA encoding AtADCS starting at S44 was amplified by PCR from a cDNA library synthesized from total RNA isolated from Arabidopsis leaves (*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia), using the following pair of primers: 5'-TAGGCTAGCTGTCGTAGTAAACTACGAGGAA (forward) and 5'-CCCTCGAGCTATTGTCTCCTCTGATCACTACAAAATCC (reverse). The PCR product was ligated into the expression vector pET28b (Novagen) between the *NheI* and *XhoI* restriction sites. Using this cloning strategy, one

His₆-tag sequence carried by the vector was added in-frame to the 5' end of the construct. Transformation of *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL cells (Stratagene) was performed. The cells were grown in M9 minimal medium, containing 1 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.2% (w/v) glucose, 50 µg ml⁻¹ kanamycin and 35 µg ml⁻¹ chloramphenicol, at 37 °C until A₆₀₀ ~0.6. Then, the temperature was lowered to 16 °C and protein production was induced by adding 0.5 mM IPTG. Cells were harvested after 24 h by centrifugation at 4 °C.

Purification of the recombinant AtADCS

Cells harvested from 1 l of culture (OD₆₀₀ = 2.5) were suspended in 20 ml buffer A [0.1 M Tris/HCl (pH 8.0), 0.3 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM L-glutamine and 10% (v/v) glycerol] containing 5 mM β-mercaptoethanol, and Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science). Cells were disrupted by sonication, centrifuged (15,000g, 4 °C, 30 min) and the supernatant was applied to a 2 ml Ni-Sepharose™ High Performance column (GE Healthcare) equilibrated with buffer A. The column was washed with the same buffer containing 50 mM imidazole then the enzyme was eluted with 200 mM imidazole in buffer A. Samples collected from the Ni-Sepharose were desalted on PD-10 columns (GE Healthcare) equilibrated with buffer B (buffer A without L-glutamine) and concentrated by centrifugation (Microsep, 30 kDa cut-off, Pall Filtron) to a final concentration of 10 mg protein/ml. Proteins were quantified with a Bradford [31] assay using BSA as standard. Purification was achieved on size exclusion chromatography (Superdex 200, 16/60, GE healthcare) in buffer B at 4 °C.

The quality of the purification was determined after SDS/PAGE analysis and staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. On average, 5 mg of protein were obtained from 1 l of culture and the purity of the recombinant protein obtained through this two-step purification procedure was about 93–97%.

Expression and purification of the recombinant EcADCL

The *E. coli* gene for ADCL was amplified by PCR from genomic DNA using the forward primer 5'-ATTGCTAGCATGTTCTTAATTAACGGTCA and the reverse primer 5'-TAAGCGGCGCATTGGGCGCTCA CAAAGTG. The PCR product was digested and ligated into the vector pET28a (Novagen) between the *NheI* and *NotI* restriction sites. Using this cloning strategy, two His₆-tag sequences carried by the vector were added in-frame to the 5' and 3' end of the construct. Transformation of *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL cells (Stratagene) was performed. Cells were grown on LB media (Roth) containing 50 µg/ml kanamycin and 35 µg/ml chloramphenicol at 37 °C until A₆₀₀ ~0.8. Then, cells were transferred at 16 °C and 25 µg/ml pyridoxine chlorides were added. Protein production was induced after 30 min by adding 0.2 mM IPTG and cells were harvested after 16 h by centrifugation at 4 °C.

Cells harvested from 800 ml of culture (OD₆₀₀ = 2) were suspended in 25 ml of buffer B containing 2 mM DTT, 50 µM PLP and EDTA-free Complete™ protease inhibitor cocktail. Cells were disrupted by sonication and centrifuged at 15,000g for 30 min at 4 °C. Imidazole (20 mM) were added to the supernatant, which was applied to a 2 ml Ni-Sepharose™ High Performance column (GE Healthcare) equilibrated with buffer B containing 50 µM PLP and 20 mM imidazole. The column was washed with buffer B containing 50 mM imidazole, and then EcADCL was eluted with 200 mM imidazole in buffer B. This last fraction was concentrated and desalted on a PD-10 column equilibrated with buffer B containing 50 µM PLP. On average, 20 mg of purified protein were obtained from 0.8 l of culture.

Determination of GAT and ADCS activities

GAT activity can be determined by measuring the production of glutamate, and ADCS activity by the production of ADC, pyruvate or pABA. Standard assays contained 100 mM Tris/HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 5% V/V glycerol, 5 mM DTT, 0 to 1 mM L-glutamine, 0 to 1 mM chorismate (Sigma) and 10–20 µg ml⁻¹ (100–200 nM) of the recombinant plant enzyme. The presence of an excess of EcADCL (20 µg ml⁻¹, 600 nM) is required for the production of pyruvate and pABA. All our assays were made in triplicate and expressed ± SD.

Pyruvate and glutamate concentrations were estimated using, respectively, lactate and glutamate dehydrogenase-coupled assays as described [32,33]. In both cases, the samples were first incubated for various times at 37 °C and the reaction was quickly stopped by freezing in liquid nitrogen. After thawing and centrifugation at 4 °C (16,000g, 2 min) through a 10 kDa cut-off membrane (Amicon Ultra-0.5, Millipore) to remove the proteins, the amount of L-glutamate or pyruvate present in the filtrate was estimated either from the change in absorbance (340 nm) or the change in fluorescence (excitation 340 nm, emission 450 nm) due to NADH synthesis (glutamate) or consumption (pyruvate). In separate control experiments, we verified that the activities of both enzymes were negligible during the time required for thawing and centrifugation at 4 °C (less than 5 min). Alternatively, glutamate and pyruvate production could be continuously monitored during the incubation period. In this case, incubation took place in the spectrophotometer or fluorimeter cuvette in the presence of an excess of glutamate dehydrogenase (GDH) and 1 mM NAD, or in the presence of 100 µM NADH and an excess of ADCL and lactate dehydrogenase (LDH). pABA concentration was monitored by its fluorescence emission at 340 nm (excitation 290 nm). As for glutamate and pyruvate, pABA could be measured either after incubation of the samples for various periods at 37 °C, or by continuous determination of pABA, directly in the cuvette of the fluorimeter.

For ADC determinations, samples were first incubated for various times at 37 °C without ADCL, and the reaction was quickly stopped by freezing. After thawing and centrifugation at 4 °C through a 10 kDa cut-off membrane to remove ADCS (see above), ADC present in the filtrate was converted into pABA by addition of ADCL, then the fluorescence emission at 340 nm was monitored.

NMR measurements

Glutamine, glutamate, ADC, pABA and NH₃ were simultaneously detected using a Bruker NMR spectrometer (AMX 400, WB) equipped with a 10 mm multinuclear probe tuned at 40.55 MHz for ¹⁵N NMR studies. Acquisitions were carried out with 8 µs pulses (70°) at 3 s intervals and a spectral width of 16 kHz. Broad-band decoupling at 10 W during acquisition and 0.5 W during delay was applied using Waltz sequences; the signal was digitized using 64,000 data points zero-filled to 128,000 and processed with either 0.5 or 0.2 Hz exponential line broadening. ¹⁵N NMR spectra were referenced to ¹⁵N-ammonium chloride (pH 7.5 in H₂O/D₂O 20%) at 0 ppm. 2-¹⁵N-L-glutamine, 5-¹⁵N-L-glutamine, 2-¹⁵N-L-glutamate, 4-¹⁵N-pABA and ¹⁵NH₄⁺ peaks were identified and quantified with calibrated solutions of L-glutamine, L-glutamate, pABA and NH₄Cl. In our experimental conditions, the peak area/mole ratio for the amino groups of glutamate, glutamine and pABA were similar whereas that of NH₄Cl was lower due to its slower relaxation. Peak corresponding to the amino group of ADC (4-¹⁵N-ADC) was identified from its disappearance associated with the presence of ADCL. It was quantified with the same calibration value used for glutamate, glutamine and pABA. No other peak was detected in the whole spectra (from 380 to -20 ppm).

Assays (final volume 1.8 ml) were conducted in 2 ml eppendorf tubes sealed with a rubber top to avoid any release of NH₃.

into the atmosphere. Standard assays contained 20 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl_2 , 2% v/v glycerol, 3 mM 2,5- ^{15}N -L-glutamine (98% enriched), 2.5 mM chorismate and 350 μg of the recombinant AtADCS. In one condition, EcADCL (400 μg) was added. After 20 min the reaction was stopped by injection through the rubber top of 4 μl 6 N HCl (final pH 4.5, at this pH all ammonia is under the form NH_4^+). After centrifugation, the sample was transferred into the NMR tube and 400 μl of D_2O were added. In separate control experiments we verified that ADC concentration was not affected by the acid treatment.

Results

Sequence analysis of bifunctional GAT–ADCS

BLAST searches of UniProtKB database with the protein sequence of *Arabidopsis* revealed that bifunctional GAT–ADCS were not restricted to eukaryotic organisms. Indeed, many bacteria from various groups (including actinobacteria, α - and γ -proteobacteria, cyanobacteria) contain a bifunctional GAT–ADCS. All identified bifunctional GAT–ADCS are large proteins of 700–1000 amino acids, the ADCS domain (about 400–500 residues) always at the C-terminal part. The domain organization described in the Pfam database indicates that a small group (11 out of 131 identified GAT–ADCS sequences) comprising land plants have an insertion of about 40–50 amino acids near the end of the GAT domain. We compared 30 GAT–ADCS sequences representative of plants, fungi, apicomplexa and bacteria (see Supplementary Fig. 1). They all contain the consensus sequence PIKGT in their ADCS domain (except *Aspergillus* that display PMKGT), where K corresponds to K274 in *E. coli* PabB (see Supplementary Fig. 2), a residue involved in the nucleophilic attack of C2 of chorismate [18,19]. Thus, it is likely that all bifunctional ADCS share a same catalytic mechanism, identical to that described for *E. coli*. This is not the case for all monofunctional PabB enzymes. Indeed, it was recently shown that the lysine in the consensus sequence PIKGT is replaced by an alanine in *B. subtilis* PabB (A283 in *B. subtilis*, see Supplementary Fig. 2). The consequence of this replacement is that two NH_3 are required for amination of chorismate: the first one is required to drive the nucleophilic attack of C2 of chorismate, and the second one is involved in the amination at position C4 of the molecule [18,20]. Supplementary Fig. 1 also indicates the presence in GAT–ADCS sequences of a conserved glutamate (consensus sequence SPE*F) required for the cleavage of the C4 hydroxyl group of chorismate [18].

Production of the recombinant *A. thaliana* GAT–ADCS

Arabidopsis GAT–ADCS is a plastidial protein containing a transit peptide. By alignment of the plant enzyme with the *E. coli* PabA, the length of this transit peptide was initially estimated to be 82 amino acids [27]. However, analysis of the N-terminal part of the protein by software such as TargetP suggested a shorter transit peptide of 43 amino acids. In addition, *in silico* analysis of the globularity/disorder [34] of the plant GAT–ADCS suggested that the N-terminal part of the longer mature protein forms a globular domain, which is not apparent in the shorter form. Therefore, we cloned and produced a new recombinant GAT–ADCS, longer than in our previous study [29], deleting only the first 43 amino acids (Supplementary Fig. 3). The yield of the purified protein was about 5 mg per liter of culture, a 15-fold increase compared to the shorter protein [29]. Also, the stability of the plant GAT–ADCS was markedly improved: after 3 h at 20 °C, the longer form still retained 100% of the activity whereas the short one lost one third, thus indicating that the N-terminal part of this protein is important in the maintenance of a stable conformation. The kinetic parameters of the new

protein are shown in Table 1. With our new construct, the GAT activity was five times higher than previously reported, displaying k_{cat} values now similar to *E. coli* PabA [12]. Also, the K_m for glutamine was significantly lowered by a factor of 10, supporting the hypothesis that the first 40 amino acids are important to allow proper folding of the domain. Similar results (k_{cat} , K_m for glutamine and $K_{0.5}$ for chorismate) were obtained with His-tag at the C-terminus of the protein, indicating that the presence of the tag did not significantly impact the activity. In the previous report we observed that dihydrofolate and methotrexate could partially inhibit AtGAT–ADCS [29]. However, we were not able to confirm these results with the present protein, suggesting that this inhibition was linked to the instability of the former enzyme.

GAT activity

As previously observed [29], the GAT domain could operate independently (no chorismate, thus no ADCS activity) in the presence of glutamine alone. However, the presence of chorismate markedly increased the rate of glutamine cleavage, increasing four times the catalytic efficiency (Table 1). The effect of chorismate on the GAT activity was readily observed when the glutamate production was continuously monitored (Fig. 2A), using a coupled assay with glutamate dehydrogenase (see Materials and methods). The stimulation by chorismate was rapid, although not immediate (Fig. 2B), but the observed lag might result from the coupled assay, since glutamate had to build up to the point where its conversion to α -ketoglutarate by GDH matched the rate of its formation before ADCS reaction became fully limiting. The chorismate concentration required to obtain half the activation ($K_{0.5}$) was about 2 μM , similar to the K_m of chorismate measured for pABA production (Table 1). This could suggest that removing of NH_3 by chorismate is critical for optimal GAT activity. From this point of view, we observed that NH_4Cl in the external medium inhibited the GAT reaction ($K_i = 5 \pm 1 \text{ mM}$, a value lowered to 270 μM if we consider that NH_3 and not NH_4^+ is the true inhibitor, and assuming a pK_a value of 9.24). This inhibitory effect did not result from an increase of the ionic strength of the medium brought about by NH_4Cl since high concentrations of NaCl had little effect on the activity (a maximal decrease of 20% was observed in the presence of 400 mM NaCl, result not shown). It is difficult to estimate the NH_3 concentration in the catalytic pocket during the course of the glutaminase reaction, but the situation is probably complex since the return to the initial velocity once all chorismate has been converted to pABA and pyruvate appeared quite slow. Indeed, as shown in Fig. 3A 50 nmol of chorismate were consumed in 10–12 min within our experimental conditions, resulting in a plateau for pyruvate accumulation. Despite this, the rate of glutamate production remained at full speed for at least 10 more minutes. This observation strongly suggests that the induced activation by chorismate also involved a complex activation process, such as conformational change. Since the K_m for glutamine was similar in both conditions, it is likely that these changes did not affect the amino acids directly involved in the binding of glutamine.

Finally, we observed that the maximal activities of the two domains were not identical. In fact, in all our conditions, the rate of glutamate and NH_3 production (GAT activity) surpassed by a factor of three, in average, the rate of pyruvate or pABA production (Figs. 3B, 4D and 5A). When glutamate and pyruvate productions were continuously monitored (a situation that better reflected initial velocities) using coupled systems, GAT–ADCS and GDH for glutamate, GAT–ADCS, ADCL and LDH for pyruvate, similar results were obtained (results not shown). Also, varying substrate and protein concentrations, and varying the pH in the range 7–9 did not improve the GAT/ADCS activity ratio.

Table 1
Kinetic properties of the GAT and ADCS domains.

Reaction	K_m Gln (μ M)	K_m $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ (mM)	K_m Cho (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
^a GAT (no ADCS)	50 ± 10	–	–	0.23 ± 0.065	$0.46 \times 10^4 \pm 0.22 \times 10^4$
^b ADCS (no GAT)	–	195 ± 40	9 ± 2	0.12 ± 0.025	0.61 ± 0.25 ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$)
^c GAT+ ^d ADCS	^c 45 ± 5 ^d 64 ± 8	–	^a 1.6 ± 0.5 ^d 2.2 ± 0.5	^c 0.79 ± 0.16 ^d 0.22 ± 0.05	$1.33 \times 10^4 \pm 0.57 \times 10^4$ (Cho) ^c $1.75 \times 10^4 \pm 0.54 \times 10^4$ (Gln) ^d $0.34 \times 10^4 \pm 0.12 \times 10^4$ (Gln) ^d $10.0 \times 10^4 \pm 4.5 \times 10^4$ (Cho)

– Not involved in the reaction measured. When two substrates were involved, K_m for one substrate was measured in the presence of saturating amount of the other, i.e., 100 μ M for chorismate, 500 μ M for glutamine and 400 mM for NH_4Cl .

^a GAT activity: glutamate production in the absence of chorismate (no ADCS activity).

^b ADCS activity: NH_3 -dependent pABA production in the absence of glutamine (no GAT activity).

^c GAT activity: glutamate production in the presence of chorismate.

^d ADCS activity: pABA or pyruvate production in the presence of glutamine.

^e Apparent $K_{0.5}$ of chorismate for the activation of GAT (calculated from the hyperbolic, Michaelis-Menten like, curve representing the chorismate-dependent activation of GAT, i.e., GAT activity in the presence of chorismate minus GAT activity without chorismate).

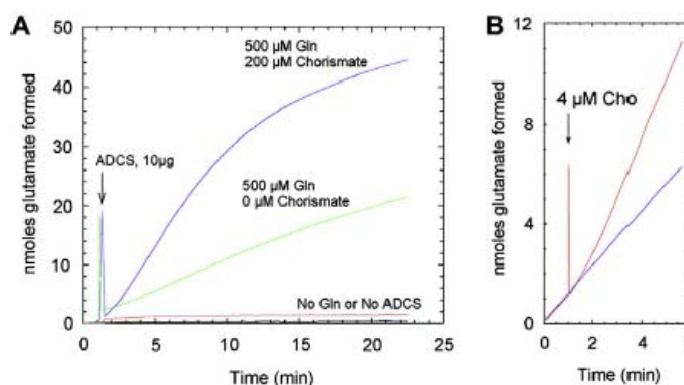


Fig. 2. Effect of chorismate on the GAT activity. (A) Continuous determination of the glutamate produced either in the presence or absence of 200 μ M chorismate. The reaction was initiated by addition of ADCS. The decrease of the rate observed after 10–12 min is due to accumulation of oxoglutarate and reversibility of the glutamate dehydrogenase reaction. (B) Effect of addition of chorismate (4 μ M) during the course of glutamate production. No chorismate was present when the reaction was initiated by ADCS.

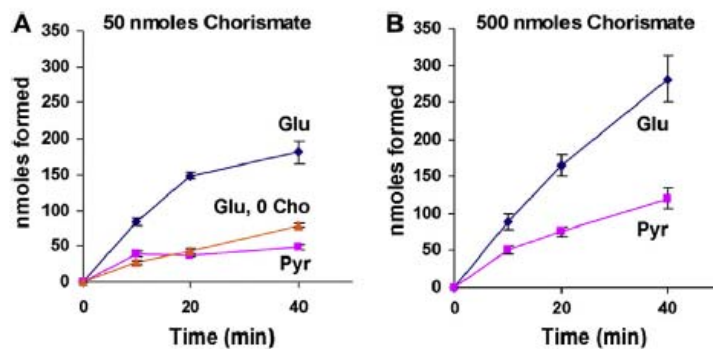


Fig. 3. Coupling between the glutamate and pyruvate productions during pABA synthesis. (A) The reaction in a volume of 0.5 ml contained 20 μ g of ADCS and ADCL, 1 mM glutamine and 100 μ M chorismate (50 nmol). In one control condition there was no chorismate. All the chorismate was consumed in about 10 min. \blacklozenge , Glutamate; \blacksquare , pyruvate; \blacktriangle , glutamate, no chorismate. (B) The reaction in a volume of 0.5 ml contained 20 μ g of ADCS and ADCL, 1 mM glutamine and 1 mM chorismate (500 nmol). \blacklozenge , Glutamate; \blacksquare , pyruvate.

ADCS activity

As for the GAT domain, the ADCS domain could operate independently (no glutamine, thus no GAT activity) in the presence of

NH_4Cl , chorismate and saturating amounts of ADCL. In the presence of glutamine instead of NH_4Cl , the K_m of chorismate decreased four times and the V_m of ADCS increased two fold (Table 1), thus increasing the catalytic efficiency versus chorismate by a factor

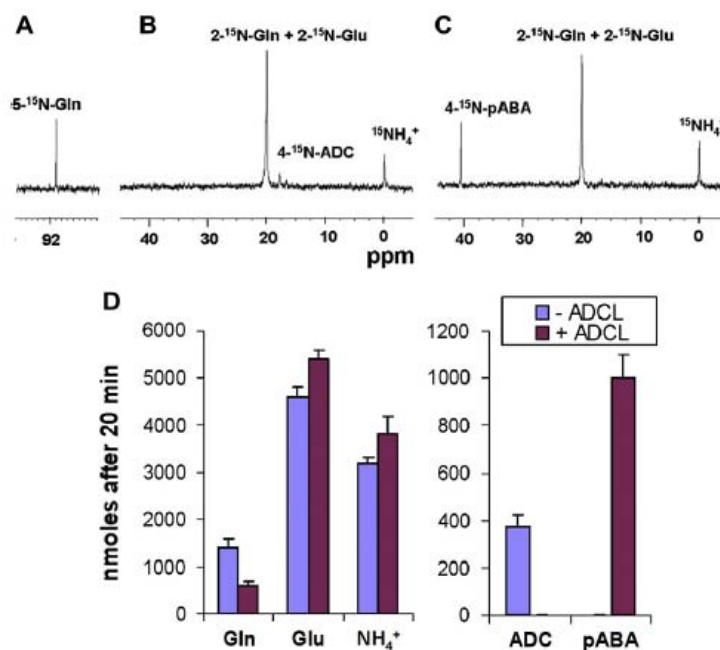


Fig. 4. ^{15}N NMR analysis of the products of the reaction catalyzed by ADCS. The reaction (2 ml) was running for 20 min in presence of 350 μg ADCS, 3 mM ^{15}N -glutamine (6000 nmol) and 2.5 mM chorismate, with or without EcADCL (400 μg). The reaction was stopped by dropping the pH to 4.5 (see Materials and methods). (A) Chemical shift in the region of 90 ppm showing the resonance peak of $5\text{-}^{15}\text{N}$ -glutamine (91.15 ppm). (B) No ADCL in the incubation medium. Chemical shifts in the region 0–40 ppm showing the resonance peaks of $2\text{-}^{15}\text{N}$ -glutamine plus $2\text{-}^{15}\text{N}$ -glutamate (19.85 ppm; the two peaks are overlapping at pH 4.5), $4\text{-}^{15}\text{N}$ -ADC (17.77 ppm) and $^{15}\text{NH}_4^+$ (–0.08 ppm). (C) EcADCL present in the incubation medium. Chemical shifts in the region 0–40 ppm showing the disappearance of $4\text{-}^{15}\text{N}$ -ADC and the appearance of $4\text{-}^{15}\text{N}$ -pABA (40.51 ppm). (D) Histogram showing the amounts of glutamine remaining after the incubation period and the amounts of glutamate, NH_4^+ , ADC and pABA produced in presence or in absence of EcADCL. The amount of Glu was calculated from the difference of area between peaks at 19.85 ppm (Glu + Gln) and 91.15 ppm (Gln).

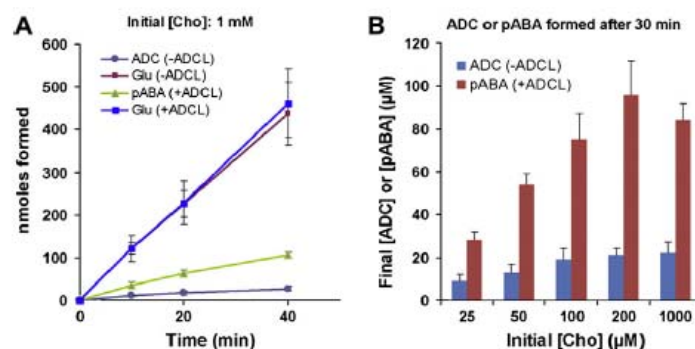


Fig. 5. Comparison between the rates of ADC and pABA production. The reaction was run for different times in presence of 20 μg ADCS, 1 mM glutamine and various amounts of chorismate (25–1000 μM), with or without EcADCL (20 μg). The enzymes were removed and ADC was determined after its conversion to pABA by a subsequent addition of EcADCL. pABA was directly measured by its fluorescence emission at 340 nm (see Materials and methods). (A) Comparison between glutamate and ADC production (no ADCL) in one hand, and glutamate and pABA production (plus ADCL) on the other hand. The initial concentration of chorismate was 1 mM. (B) Effect of varying the initial chorismate concentration on the final ADC and pABA concentrations after 30 min. Note that for concentrations of 25 and 50 μM , all chorismate was transformed into pABA in the presence of ADCL.

eight. The shift of K_m observed for chorismate possibly reflected some adjustment of the chorismate binding pocket induced by the GAT activity. Most spectacular, was the 10^4 increase of the catalytic efficiency versus NH_4Cl when external NH_4Cl was replaced by glutamine. This resulted from the high K_m value (200 mM)

recorded for NH_4Cl (Table 1). Even if we only consider the NH_3 species present in the external medium rather than the sum $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, the K_m would be 11 mM, a value still 200 times higher than that recorded for glutamine. Altogether, these results show that NH_3 cleaved from glutamine (GAT activity) was either

released in the bulk medium (thus poorly contributing to ADC synthesis) or used for ADC synthesis without equilibrating with the external pool. This clearly indicates a channeling of NH_3 between the two domains. Interestingly, the K_m of glutamine measured in the presence of saturating amount of chorismate was similar for GAT (glutamate production) and ADCS (pABA production). In this last case, this is an apparent K_m mirroring, in fact, the amount of NH_3 available for ADC synthesis. In such a situation, the GAT activity was always higher than that of ADCS, whatever the glutamine concentration, and the amount of NH_3 used for the ADCS reaction was always a fraction of the amount produced. Although the migration of ammonia from the site of synthesis to the site of utilization was not reported to be rate limiting in other glutamine amidotransferases such as carbamoyl phosphate synthetase or glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase [23,35], our results strongly suggest that NH_3 delivery to the ADCS domain or chorismate amination are the limiting steps of the whole process.

Impact of ADCL upon GAT and ADCS activities

Most of the studies concerning ADCS activity have used a system coupled with ADCL, pABA or pyruvate accumulation being related to ADC production. However, the quick removal of ADC (the end product of the reaction) might mask important regulation of the activity. Therefore, we compared the rate of ADC production by GAT–ADCS alone with the rate of pABA production by the coupled system GAT–ADCS plus lyase. To have a direct access to all players (except pyruvate) involved in these two reactions, we used ^{15}N -glutamine and NMR spectroscopy (see Materials and methods) to estimate ^{15}N -glutamine, ^{15}N -glutamate, $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$, ^{15}N -ADC and ^{15}N -pABA (Fig. 4A–C). As shown in Fig. 4D, we confirmed by this novel approach that glutamate, ADC and pABA were not produced in stoichiometric amounts. In addition, the ADC concentration measured after 20 min in the absence of ADCL was significantly lower than that of pABA obtained in similar conditions but in the presence of non limiting amounts of ADCL. This indicates that ADC has to be removed to obtain maximal ADCS activity, suggesting some feedback regulation. NMR was useful to have a simultaneous determination of most substrates and products involved in pABA synthesis. However, this technique lacks sensitivity and requires large amounts of enzymes and substrates. Thus, to confirm the NMR observations, we developed an easier and quicker method to estimate ADC concentration. This method involved removing the GAT–ADCS by rapid filtration on a 10 kDa cut-off membrane, then determination of the ADC present in the filtrate after its conversion into pABA by a subsequent addition of ADCL (see Materials and methods). The production of ADC was quite low in the absence of ADCL, but the amount of glutamate produced was not changed (Fig. 5A). Increasing the initial chorismate concentration from 25 to 1000 μM resulted in a slight increase of ADC (Fig. 5B), the final ADC concentration being always 3–4 times lower after 30 min than the corresponding pABA concentration obtained in the presence of ADCL.

Discussion

Comparison between the plant GAT–ADCS and prokaryotic *E. coli* complex PabA/PabB shows similarities between the two systems. First, PabA, once associated with PabB, displayed a glutaminase activity that was two times higher in the presence than in the absence of chorismate [12]. Second, when the PabA/PabB complex was associated with non limiting amounts of PabC, the glutamate production was 1.5–1.8 times higher than that of pABA and pyru-

vate [25], indicating that PabA activity was higher than that of PabB. Our results suggest that activation by chorismate of the plant GAT involved complex regulatory processes such as conformational changes of the enzyme. A similar conclusion was reached with the prokaryotic PabA/PabB system, as PabA activation by chorismate also occurred in the absence of Mg^{2+} , a situation where PabB was catalytically inefficient [12]. Clearly, the chorismate-dependent activation was independent on the amination reaction. In the presence of chorismate, NH_3 is likely channeled towards the chorismate binding site. Thus, it is possible that the presence of chorismate was required to 'open' the NH_3 channel connecting the two domains, a conformational change associated with an increase of the GAT domain k_{cat} . Unfortunately, all our crystallogensis attempts remained unsuccessful and it was not yet possible to confirm this hypothesis through structural studies.

GAT and ADCS activities appeared significantly unbalanced. We did not find any condition where the rate of pyruvate production matched that of glutamate. Varying glutamine and chorismate concentrations and varying the amount of protein did not affect the coupling. It is not clear, however, if NH_3 cleaved from glutamine can be readily protonated in the catalytic pocket. This probably depends on a number of factors including external pH, size and accessibility of the pocket, polarity of the surrounding amino acid residues, or position of the channel entry to quickly remove NH_3 from the production site. Assuming that NH_3 is the only species channeled toward the ADCS domain, a partitioning between ammonia and ammonium within the GAT catalytic pocket could limit the amount of NH_3 transferred toward the ADCS domain. All our experiments were made in a medium at pH 8, a value close to the pH found in chloroplasts and *a priori* representative of the *in vivo* situation. However, varying the pH in the range 7–9 did not improve the GAT/ADCS activity ratio. Even at pH 9, the ADCS activity remained 3–3.5 lower than that of GAT, although this situation strongly favoured NH_3 that represented 37% of $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, to compare with 5–6% at pH 8. We conclude from these observations that the external pH has no significant impact on the delivery of ammonia to the ADCS domain and that the low coupling of the two activities probably relies on intrinsic properties of the protein. It is likely that, *in vivo*, the NH_3 (NH_4^+) and glutamate released in the plastids by this 'futile' activity could be easily recycled by the potent glutamine synthetase present in these organelles. Such 'leaky' glutaminase activity is not uncommon within the enzymes of the GAT family. For example, it was reported that GMP synthase from *P. falciparum* displayed a leaky GAT activity in the absence of XMP and ATP [36].

Our results indicate for the first time that ADCS activity (production of ADC) is enhanced by the presence of ADCL. This suggests that ADC retro-inhibits its synthesis and cannot accumulate. It is difficult at this stage to propose a mechanism of inhibition (feedback control, competitive inhibition with chorismate or reversibility of the reaction), but the question arises whether such a regulation is of physiological importance. Chorismate is at the branch point of many pathways to synthesize both primary metabolites such as aromatic amino acids and diverse secondary metabolites including folates in bacteria, fungi and plants. Its partitioning and utilization must be therefore highly controlled, and the observed inhibition of ADCS by ADC could participate to such regulation.

Finally, most of the actual researches concerning inhibition of the pABA branch of the folate pathway has focused on PabB and chorismate analogs/competitors [21,37–39]. Our results with the bifunctional GAT–ADCS indicate that ADC formation relies entirely on the GAT domain for NH_3 delivery, and that high rates of ADC production are only achieved in the presence of ADCL. Thus, GAT and ADCL represent two interesting alternatives for the development of new inhibitors of pABA synthesis in eukaryotic cells.

Acknowledgments

We thank Dr. Claude Alban, Dr. Stéphane Ravel and Dr. Pierre Gans for critical and helpful readings of the manuscript. This work and the Ph.D. fellowship to D.C. were supported by the Région Rhône-Alpes (Cluster 9, 'Plantacter'). The salary of C.R.-C. was supported by Grenoble University.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.abb.2010.09.010.

References

- [1] F. Rebeille, S. Ravel, S. Jabrin, R. Douce, S. Storzhenko, D. Van Der Straeten, *Physiol. Plant.* 126 (2006) 330–342.
- [2] F. Rebeille, S. Ravel, A. Marquet, R.R. Mendel, A.G. Smith, M.J. Warren, *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 949–962.
- [3] S. Ravel, R. Douce, F. Rebeille, The uniqueness of tetrahydrofolate synthesis and one-carbon metabolism in plants, in: D.A. Day, H. Millar, J. Whelan (Eds.), *Plant Mitochondria from Genome to Function*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 2004, pp. 277–292.
- [4] D. Blanquaert, S. Storzhenko, K. Loizeau, H. De Steur, V. De Brouwer, J. Vienne, S. Ravel, F. Rebeille, W. Lambert, D. Van Der Straeten, *Crit. Rev. Plant Sci.* 29 (2010) 14–35.
- [5] H. De Steur, X. Gellynck, S. Storzhenko, L.Q. Ge, W. Lambert, D. Van Der Straeten, J. Vienne, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 554–556.
- [6] R. Diaz De La Garza, J. Gregory III, A.D. Hanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 4218–4222.
- [7] A. Nzila, *Drug Discovery Today* 11 (2006) 939–944.
- [8] S. Storzhenko, V. De Brouwer, M. Volckaert, O. Navarrete, D. Blanquaert, G.F. Zhang, W. Lambert, D. Van Der Straeten, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1277–1279.
- [9] A. Kohle, S. Sommer, K. Yazaki, A. Ferrer, A. Boronat, S.M. Li, L. Heide, *Plant Cell Physiol.* 43 (2002) 894–902.
- [10] D. Siehl, The biosynthesis of tryptophan, tyrosine and phenylalanine from chorismate, in: B.K. Singh (Ed.), *Plant Amino Acids*, Marcel Dekker Inc., New York, 1999, pp. 171–204.
- [11] B.P. Nichols, A.M. Seibold, S.Z. Doktor, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 8597–8601.
- [12] B. Roux, C.T. Walsh, *Biochemistry* 31 (1992) 6904–6910.
- [13] Q.Z. Ye, J. Liu, C.T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 9391–9395.
- [14] K.T. Ziebart, M.D. Toney, *Biochemistry* 49 (2010) 2851–2859.
- [15] O. Kerbarh, A. Ciulli, D.Y. Chirgadze, T.L. Blundell, C. Abell, *ChemBioChem* 8 (2007) 622–624.
- [16] Z. He, K.D. Stigers Lavoie, P.A. Bartlett, M.D. Toney, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 2378–2385.
- [17] O. Kerbarh, E.M. Bulloch, R.J. Payne, T. Sahr, F. Rebeille, C. Abell, *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005) 763–766.
- [18] Z. He, M.D. Toney, *Biochemistry* 45 (2006) 5019–5028.
- [19] J.F. Parsons, P.Y. Jensen, A.S. Pachikara, A.J. Howard, E. Eisenstein, J.E. Ladner, *Biochemistry* 41 (2002) 2198–2208.
- [20] H.S. Schadt, S. Schadt, F. Oldach, R.D. Sussmuth, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 3481.
- [21] M.C. Kozlowski, N.J. Tom, C.T. Seto, A.M. Seifler, P.A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 2128–2140.
- [22] E.M. Bulloch, M.A. Jones, E.J. Parker, A.P. Osborne, E. Stephens, G.M. Davies, J.R. Coggins, C. Abell, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9912–9913.
- [23] Y.B. Fan, L. Lund, Q. Shao, Y.Q. Gao, F.M. Raushel, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 10211–10219.
- [24] F.M. Raushel, J.B. Thoden, H.M. Holden, *Biochemistry* 38 (1999) 7891–7899.
- [25] J.M. Green, B.P. Nichols, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 12971–12975.
- [26] V.K. Viswanathan, J.M. Green, B.P. Nichols, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 5918–5923.
- [27] G.J. Basset, E.P. Quinlivan, S. Ravel, F. Rebeille, B.P. Nichols, K. Shinozaki, M. Seki, L.C. Adams-Phillips, J.J. Giovannoni, J.F. Gregory 3rd, A.D. Hanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004).
- [28] J.C. Edman, A.L. Goldstein, J.G. Erbe, *Yeast* 9 (1993) 669–675.
- [29] T. Sahr, S. Ravel, G. Basset, B.P. Nichols, A.D. Hanson, F. Rebeille, *Biochem. J.* 396 (2006) 157–162.
- [30] G.J.C. Basset, S. Ravel, E.P. Quinlivan, R. White, J.J. Giovannoni, F. Rebeille, B.P. Nichols, K. Shinozaki, M. Seki, J.F. Gregory 3rd, A.D. Hanson, *Plant J.* 40 (2004) 453–461.
- [31] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [32] E. Bemt, H.U. Bergmeyer, UV-assay with glutamate dehydrogenase and NAD, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press Inc., New York, San Francisco, London, 1974, pp. 1704–1708.
- [33] R. Czok, W. Lamprecht, Pyruvate. Fluorimetric assay, in: H. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic analysis*, Academic Press Inc., New York, San Francisco, London, 1974, pp. 1446–1451.
- [34] R. Linding, R.B. Russell, V. Neduva, T.J. Gibson, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3701–3708.
- [35] X.S. Wang, A.E. Roitberg, N.G.J. Richards, *Biochemistry* 48 (2009) 12272–12282.
- [36] J.Y. Bhat, B.G. Shastri, H. Balaran, *Biochem. J.* 409 (2008) 263–273.
- [37] K.T. Ziebart, S.M. Dixon, B. Avila, M.H. El-Badri, K.G. Guggenheim, M.J. Kurth, M.D. Toney, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 3718–3729.
- [38] R.J. Payne, E.M.M. Bulloch, M.M. Toscano, M.A. Jones, O. Kerbarh, C. Abell, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 2421–2429.
- [39] S. Keller, H.S. Schadt, I. Ortel, R.D. Sussmuth, *Angew. Chem., Int. Ed.* 46 (2007) 8284–8286.

IV. Conclusion

La biosynthèse du pABA a lieu dans le plaste en deux étapes : la première réaction produit l'ADC à partir du chorismate et la deuxième convertit l'ADC en pABA. Suivant les espèces, la première étape est catalysée soit par deux protéines formant un hétérodimère, soit par une seule enzyme, bifonctionnelle. La nature bifonctionnelle de cette étape se retrouve chez certaines bactéries et, entre autres, chez les cyanobactéries considérées comme un chloroplaste ancestral. Il est donc possible que la fusion de ces deux protéines ait eu lieu très tôt chez des procaryotes ancestraux, et que cet événement génétique se soit transmis aux plantes et aux apicomplexes, *via* les cyanobactéries. L'avantage acquis par un tel événement n'est pas évident dans le cas de la GAT-ADCS. En effet, il est souvent considéré qu'une telle organisation permet de canaliser (channelling) l'intermédiaire réactionnel d'un domaine à l'autre en évitant qu'il diffuse dans le milieu extérieur. Cela peut limiter le temps de transit d'un site actif à l'autre (Rudolph et Stubbe 1995), maintenir des concentrations élevées de substrats au voisinage du site actif et faciliter une réaction peu favorable d'un point de vue thermodynamique (Ushiroyama et al. 1992), éviter la diffusion d'un intermédiaire toxique (Leys et al. 2003), ou encore piéger un intermédiaire pour éviter des réactions secondaires ou en compétition (James et al. 1995). Dans le cas de la GAT-ADCS, le NH_3 libéré de la glutamine est effectivement canalisé vers le site de fixation du chorismate, mais cette situation est aussi décrite pour l'hétérodimère. Dans ces conditions, l'avantage acquis par cette fusion est sans doute lié à l'expression simultanée des deux domaines, évitant ainsi des mécanismes de régulation complexe pour coordonner l'expression des deux gènes. On peut aussi émettre l'hypothèse que cette fusion puisse permettre une régulation allostérique des activités GAT et ADCS par des effecteurs qui restent à déterminer.

Nous avons observé que les deux activités portées par cette enzyme n'étaient pas étroitement coordonnées. L'activité GAT est toujours supérieure à celle de l'ADCS, l'excès de NH_3 diffusant dans le milieu extérieur et ne participant donc plus à la synthèse d'ADC. En fait, l'activité ADCS est systématiquement 3 à 4 fois plus faible que l'activité GAT, quelle que soit l'activité GAT. Ces résultats sont difficiles à interpréter. Il est possible que des effecteurs, qui restent à déterminer, participent à l'ajustement des deux réactions, et en particulier celle catalysée par l'ADCS. Nous avons testé sans succès de nombreux intermédiaires de la voie de biosynthèse du folate, et d'autres effecteurs potentiels tels que

l'anthranilate et les acides aminés aromatiques (qui dérivent aussi du chorismate). Dans nos conditions expérimentales, 1 NH_3 sur 4 est transféré vers le site ADCS, ce qui peut suggérer un manque d'efficacité du channelling. Il faut aussi prendre en considération que c'est sans doute le NH_3 (forme neutre) et non le NH_4^+ qui est canalisé. Dans ces conditions, le pH est important car il régit la répartition entre ces deux espèces ($\text{pK}_a = 9.2$). Lorsque le pH du milieu extérieur est varié entre 7 et 9, nous n'avons pas observé de différences dans le rapport des activités GAT/ADCS, malgré un changement d'un facteur supérieur à 10 dans la concentration de NH_3 . Toutefois, une variation du pH externe n'implique pas forcément un changement du pH au niveau du site catalytique, et il reste possible que la différence observée entre la production de glutamate et celle de pABA soit le reflet de la disponibilité en NH_3 à l'endroit précis où celui-ci est pris en charge pour son transfert.

Finalement nos résultats montrent que l'ADCS est fortement régulée par le produit de la réaction qui ne s'accumule jamais : en absence d'ADCL, l'ADC inhibe l'ADCS et en présence d'ADCL il est immédiatement converti en pABA. La concentration d'ADC semble donc étroitement régulée. De ce point de vue, il est possible que l'ADC ait un rôle de control important et il a été suggéré récemment que l'expression de l'ADCL pourrait être régulée par l'ADC (Waller et al. 2009).

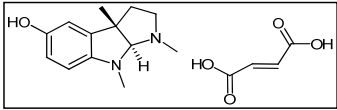
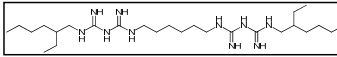
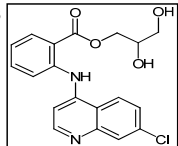
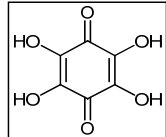
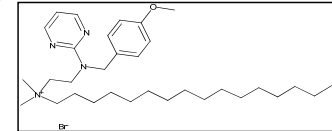
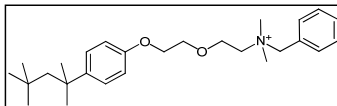
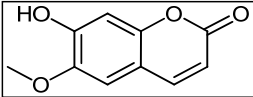
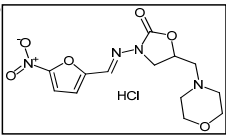
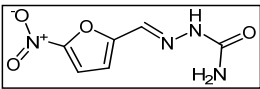
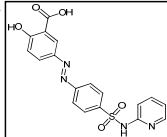
CHAPITRE II : Inhibition de la biosynthèse de l'acide para-aminobenzoïque et impact sur la croissance des plantules d'*A. thaliana* et des parasites *T. gondii* et *P. falciparum*

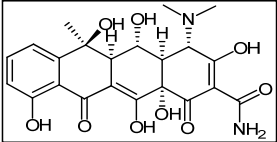
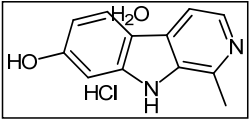
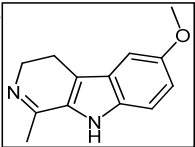
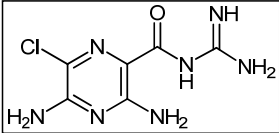
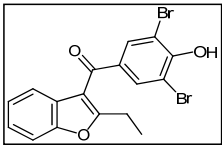
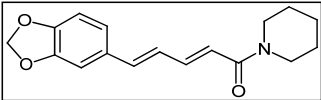
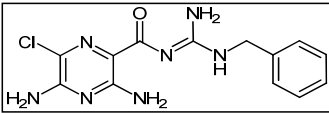
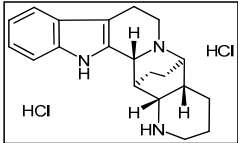
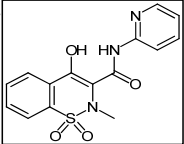
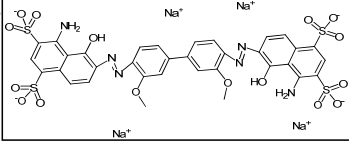
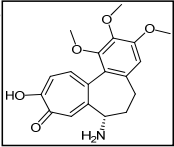
I. Recherche d'inhibiteurs spécifiques de la GAT-ADCS par des approches de criblage à haut débit

A. Le criblage

La recherche d'inhibiteurs par criblage enzymatique à haut débit nécessite de disposer d'un test d'activité qui soit fiable, simple et compatible avec la plateforme robotisée. Le test que nous avons utilisé mesure l'activité GAT de la GAT-ADCS. Il met donc en œuvre le couplage de deux activités : la GAT-ADCS et la GDH (voir Matériel et Méthodes). Nous avons mis au point un test adapté aux petits volumes (80 μ l) qui permet d'utiliser des plaques à 96 puits et qui ne consomme que de petites quantités de protéines. Dans un premier temps nous avons testé la fiabilité et la reproductibilité du test, en cherchant à obtenir un rapport signal sur bruit de fond optimal. Les paramètres que nous avons déterminés (concentrations en substrats, concentrations en enzyme, temps d'incubation précédant la mesure, nombre de points au cours de la cinétique) sont ceux qui nous ont permis d'obtenir la meilleure valeur de Z' , paramètre statistique qui doit être supérieur à 0.5 pour garantir une différence significative entre molécules actives et inactives (voir Matériel et Méthodes). Les paramètres que nous avons retenus (par puits : 80 μ l 0.1 M Tris pH 8 ; 5 mM $MgCl_2$; 25 μ M chorismate ; 600 μ M NAD ; 800 μ M glutamine ; 0.7 μ g GAT-ADCS ; 0.4 unité GDH ; mesure de l'activité après 5, 15 et 25 min) nous permettent de calculer un facteur Z' compris entre 0.68 et 0.84.

Le criblage à haut débit a été réalisé avec la chimiothèque *Prestwick*[®] qui a la particularité d'être composée de molécules déjà répertoriées et pour la plupart disponibles dans le commerce. Nous avons obtenus à la suite du criblage primaire, une centaine de molécules bioactives qui inhibaient à plus de 50% la production de NADH. Un criblage secondaire a permis de confirmer l'action d'une trentaine de ces molécules, et un troisième passage effectué en présence de glutamate et sans GAT-ADCS a permis d'éliminer les molécules spécifiquement active sur la GDH (figure 35). Les concentrations utilisées pour ces criblages étant relativement élevées (100 μ M), nous avons ensuite testé manuellement les molécules (une dizaine) qui nous semblaient les plus prometteuses afin de sélectionner celles qui étaient le plus actives (tableau 8).

Formule brute	PM	Structure	Nom chimique	Therap. group	Principal effect
C17H22N2O5	334.4		(-)-Eseroline fumarate salt	Potent analgesic	Anti-acetylcholinesterase activity
C26H58Cl2N10	581.7		Alexidine dihydrochloride	Antibacterial	Detergent
C19H18Cl2N2O4	409.3		Glafenine hydrochloride	Analgesic	-
C6H6O7	190.1		Tetrahydroxy-1,4-quinone monohydrate	Keratolytic	-
C32H55BrN4O	591.7		Thonzonium bromide		Detergent
C27H42ClNO2	448.1		Benzethonium chloride	Antibacterial	Detergent
C10H8O4	192.2		Scopoletin	Antispasmodic	
C13H17ClN4O6	360.8		Furaltadone hydrochloride	Antibacterial	Bacterial DNA damage
C6H6N4O4	198.1		Nitrofur	Antibacterial	Bacterial DNA damage
C18H14N4O5S	398.4		Sulfasalazine	Treatment of ulcerative colitis	15-hydroxydihydrogenase inhibitor

C22H28N2O11	496.5		Oxytetracycline dihydrate	Antibacterial	Ribosomal protein synthesis inhibitor
C12H13ClN2O2	252.7		Harmol hydrochloride monohydrate	Anxiolytic	Liver conjugation probe
C13H14N2O	214.3		Methoxy-6-harmalan	Psoriasis treatment	Benzodiazepine receptor ligand
C6H13Cl2N7O3	302.1		Amiloride hydrochloride dihydrate	Diuretic	Antialdosteron
C17H12Br2O3	424.1		Benzbromarone	Coronarodilator	Uric acid transport inhibitor
C17H19NO3	285.3		Piperine	Antidiarrhoea	Enzyme inhibitor
C13H15Cl2N7O	356.2		Benzamil hydrochloride		Na ⁺ channel blocker
C20H27Cl2N3	380.4		Nitrazine dihydrochloride	Hypotensive	-
C15H13N3O4S	331.4		Piroxicam	Antiinflammatory	Cyclooxygenase inhibitor
C34H24N6Na4O16S4	992.8		Chicago sky blue 6B	-	Competitive glutamate uptake inhibitor
C19H21NO5	343.4		Trimethylcolchicinic acid	Anticancer agent	Tubuline inhibitor ?

C20H18ClNO4	371.8		Berberine chloride	Antibacterial	Anti-HIV reverse transcriptase
C20H14Br2HgNa2O9	804.7		Merbromin	Antibacterial	-
C27H34I2N4	668.4		Propidium iodide	Antibacterial	Detergent
C10H9N3O	187.2		Amrinone	Cardiotonic	Phosphodiesterase inhibitor III
C11H8O3	188.2		3-Acetylcoumarin		
C10H8O3	176.2		Hymecromone	Choleretic	
C9H8O4	180.2		Caffeic acid	Antioxydant	
ADCS			GDH		
		Mixte			

Figure 35 : Molécules issues du criblage secondaire et présentant une activité inhibitrice de la réaction couplée GAT-ADCS / GDH. Un troisième criblage ciblant exclusivement l'activité GDH (pas de GAT-ADCS, et le glutamate remplace la glutamine dans le milieu réactionnel) a permis de distinguer entre un effet 100% GAT-ADCS (vert) et 100 % GDH (rose). Quelques molécules (bleu) semblent inhiber les deux activités.

A la suite de ce travail, deux molécules paraissaient plus particulièrement intéressantes : l'eseroline et l'alexidine. L'alexidine est classée comme détergeant, et, bien que cette molécule n'inhibe pas la GDH, son mode d'action n'est sans doute pas très spécifique de la GAT-ADCS. En effet, un survol de la littérature nous indique que l'alexidine est aussi un inhibiteur des tyrosine phosphatases mitochondriales ($IC_{50} = 1 \mu M$ *in vitro*), et cette molécule a été proposée comme agent anticancéreux, inducteur d'apoptose en

occasionnant des dommages au niveau des membranes mitochondriales (Yip et al. 2006). Nous avons donc décidé de concentrer nos efforts sur l'eseroline, dans l'espoir d'un inhibiteur plus spécifique. Comme nous le verrons dans l'étude qui suit, ce n'est pas en fait l'eseroline qui est responsable de l'inhibition de la GAT-ADCS, mais son produit d'oxydation, la rubreserine.

Tableau 8 : Test manuel des molécules inhibant la GAT-ADCS. Dans ce test, les concentrations d'inhibiteurs sont variées afin de déterminer les molécules les plus fortement inhibitrices. Seules deux molécules présentent des IC₅₀ apparent inférieurs à 50 μ M.

Inhibiteur	Inhibition (%)				IC 50 app.
	50 μ M	25 μ M	12.5 μ M	6 μ M	
<i>Eseroline</i>	70	40	23	9	$\approx 25 \mu\text{M}$
<i>Alexidine</i>	62	53	28		$\approx 25 \mu\text{M}$
<i>Tetrahydroxyquinone</i>	37	25	5		$> 50 \mu\text{M}$
<i>Thonzonium</i>	50	40	30		$\approx 50 \mu\text{M}$
<i>Benzethonium</i>	32	30	16		$> 50 \mu\text{M}$
<i>Furaltadone</i>	37	25	17		$> 50 \mu\text{M}$
<i>Nitrofural</i>	20	28	24		$> 50 \mu\text{M}$
<i>sulfasalazine</i>	13	28	31		$> 50 \mu\text{M}$
<i>Scopoletine</i>		6	2		$> 50 \mu\text{M}$
<i>Glafenine</i>	6	0	0		$> 50 \mu\text{M}$

B. La rubreserine inhibiteur de la GAT-ADCS

L'observation approfondie de l'effet de l'eseroline sur l'activité GAT-ADCS, indique que le potentiel inhibiteur de la solution d'eseroline augmente avec l'âge de la solution (figure 36A). Cette augmentation d'inhibition est concomitante avec l'apparition d'une coloration rouge, la solution d'eseroline évoluant d'une couleur rose pale au moment de sa préparation dans un tampon Tris/HCl pH 8, à rouge sang en quelques heures. Cette évolution de couleur est aussi caractérisée par le changement du spectre d'absorption de la solution d'eseroline (figure 36B) : un pic d'absorption à 475 nm apparaît au cours du temps et se développe en 6 h environ. Ce pic apparaît d'autant plus rapidement que la solution est agitée (oxygénée), mais n'apparaît pas lorsque le pH de la solution est maintenu < 4 (figure 36B). Nous concluons de ces observations qu'un produit d'oxydation de l'eseroline se forme à pH alcalin, et que ce produit est vraisemblablement responsable de l'inhibition. En fait, la conversion pH-dépendante de l'eseroline en rubreserine est relativement bien décrite dans la littérature (voir

chapitre suivant). La différence entre l'eseroline et la rubreserine est caractérisée par la présence sur cette dernière de deux fonctions carbonyles portées par le cycle aromatique (voir figure 38). En effet, nous avons pu vérifier par spectroscopie ^{13}C -RMN (figure 34C) la présence dans une solution d'eseroline à pH 8 de deux raies dans la région des carbonyles, raies qui sont absentes lorsque la solution est maintenue à pH 3.5. Enfin, nous avons vérifié par chromatographie HPLC en phase reverse (figure 34D) que la conversion de l'eseroline en rubreserine est effectivement complète en moins de 24 h. En effet, une solution d'eseroline à pH 8 préparée 24 h plus tôt présente un pic majeur (représentant plus de 90 % des pics détectés à 300 nm) avec un spectre sous le pic correspondant à celui de la rubreserine.

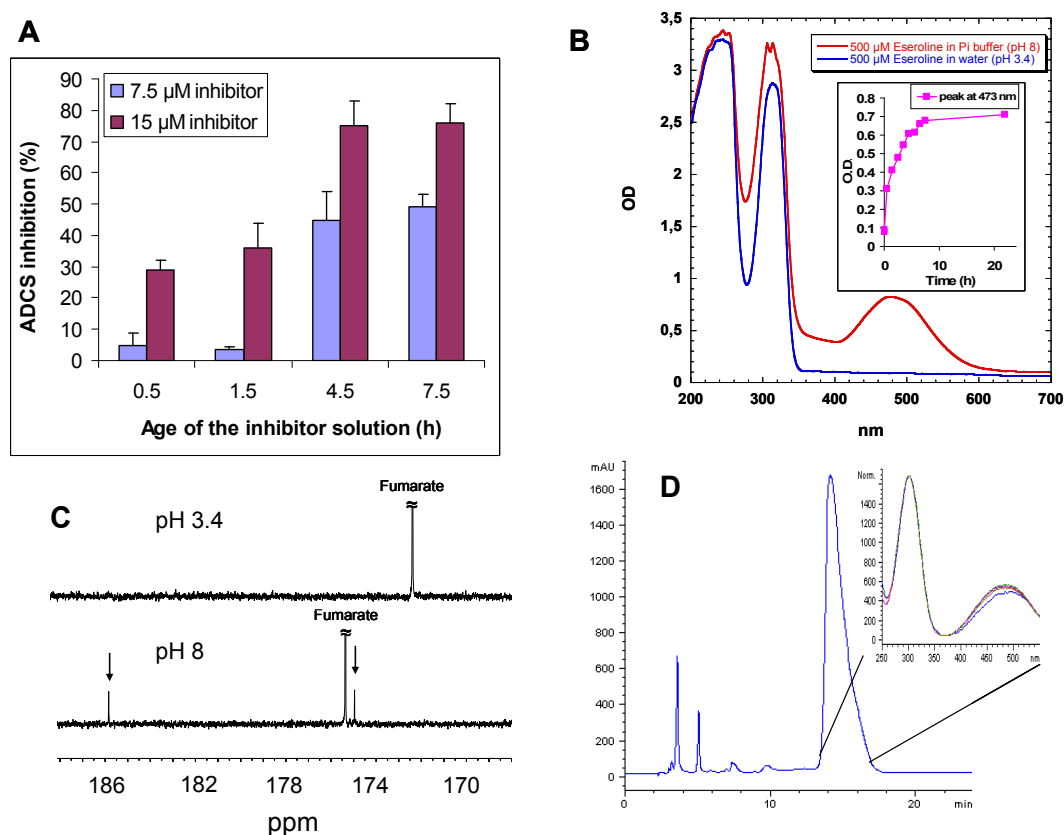


Figure 36 : Inhibition de la GAT-ADCS par la rubreserine. **A)** l'inhibition du domaine GAT de la GAT-ADCS dépend de l'âge de la solution d'eseroline. **B)** Spectre UV-Visible de deux solutions d'eseroline 500 μM incubée 24 h dans de l'eau (pH 3.4) et dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 8. L'encadré dans la figure B montre l'apparition progressive au cours du temps du pic à 475 nm dans une solution d'eseroline 10 mM dans du tampon phosphate 50 mM pH 8. **C)** Spectre RMN- ^{13}C de deux solutions d'eseroline 30 mM incubée 24 h dans de l'eau (pH 3.4) et dans du tampon Pi 50 mM pH 8. **D)** Chromatographie en phase inverse d'une solution d'eseroline incubée pendant 24h dans du tampon Pi 50 mM pH 8.

Il ressort donc de ces observations que l'eseroline s'oxyde spontanément en milieu alcalin, et que la rubreserine, produit de cette oxydation, est l'entité chimique qui inhibe

l'activité GAT-ADCS. L'eseroline est commercialisée chez Sigma® en association avec du fumarate, sans doute afin de minimiser l'oxydation de ce produit en maintenant un environnement acide. La préparation de solutions de rubreserine est donc simple puisqu'il suffit de préparer 6 à 8 h à l'avance une solution tamponnée d'eseroline à $\text{pH} \geq 7$. Nous avons aussi par ailleurs vérifié que la présence de fumarate jusqu'à des concentrations de 1 mM n'a aucun effet sur l'activité enzymatique. Enfin, il convient de noter que les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour l'eseroline dans le cadre du criblage sont des valeurs approximatives, car nous ne connaissions pas à ce moment là la concentration exacte d'inhibiteur (c'est-à-dire la rubreserine) présente dans la solution. Comme nous le verrons par la suite, les valeurs de K_i obtenues pour la rubreserine sont en fait trois fois inférieures. En fait, le criblage à haut débit nous a permis d'identifier l'eseroline comme inhibiteur potentiel de la GAT-ADCS parce que entre le moment où le robot manipulateur dilue les molécules dans le tampon de dosage et le moment où débute la mesure de l'activité il s'écoule environ 20 min, temps pendant lequel une partie de l'eseroline s'est spontanément oxydée en rubreserine. Dans le chapitre suivant, nous décrivons l'origine naturelle de ces composés.

C. L'eseroline et la rubreserine sont des produits de dégradation de la physostigmine



Figure 37 : *Physostigma venenosum*, ou Fèves de Calabar, ou Eséré ou Haricots de l'Ordalie. Plantes de la famille des *Fabaceae*, originaire d'Afrique de l'ouest. Dessin provenant du site Wikipedia (http://fr.wikipedia.org/wiki/Fève_de_Calabar).

L'éseroline est une molécule issue de la dégradation de la physostigmine (ou eserine), alcaloïde produit par la fève de calabar (*Physostigma venenosum*), une plante légumineuse d'Afrique de l'ouest (figure 37).

Autrefois, les fèves étaient administrées par décision judiciaire comme poison d'épreuve aux personnes accusées de sorcellerie ou d'autres crimes : le condamné prouvait son innocence s'il survivait à l'ingestion de plusieurs dizaines de graines. En effet la physostigmine est un poison violent, inhibiteur de l'acétylcholinestérase (Straus et Goldstein 1943) : elle augmente localement la concentration d'acétylcholine dans la fente synaptique et permet la stimulation des récepteurs nicotinique et muscariniques, ce qui aboutit à une stimulation continue des cellules réceptrices, avec pour conséquences des spasmes musculaires intenses.

Compte tenu de ses propriétés médicinales, la physostigmine a été l'objet de nombreuses études pharmacocinétiques. Cet alcaloïde est relativement instable en solution. Dans un milieu à pH supérieur à 5, exposée à l'air, à la chaleur et à la lumière, elle est dégradée en eseroline puis en rubreserine (Hemsworth et West 1970) (Rubnov et al. 1999) (figure 38). Dans un premier temps, la physostigmine est hydrolysée en eseroline qui est incolore, puis en présence d'oxygène et à température ambiante (25 °C) l'eseroline est transformée en rubreserine de couleur rouge.

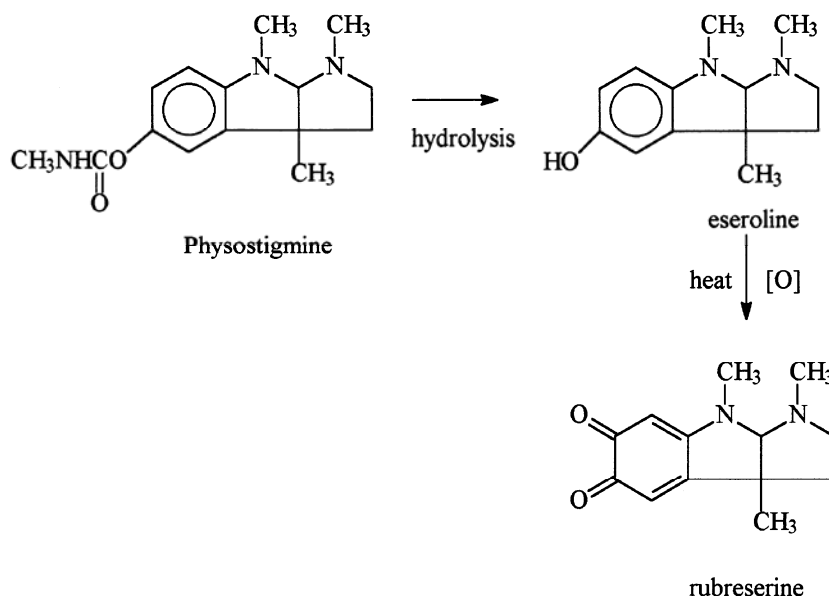


Figure 38 : Produits de dégradation de la Physostigmine.

L'éseroline et la rubreserine n'ont pas ou peu d'activité anti-acétylcholinestérase, si on les compare à la physostigmine (Ellis et al. 1943). La toxicité de la rubreserine n'est pas

connue, par contre celle de l'eseroline a été testée sur différents types de culture de cellules humaines. L'eseroline augmenterait la perméabilité des membranes des cellules en culture, provoquant une fuite des nucléotides et de certaines enzymes telles que la lactate deshydrogénase (Somani et al. 1990). Relativement peu toxique pour des cellules du foie, l'eseroline l'est davantage pour des cellules neuronales, en particulier les neuroblastes, pour lesquels des IC_{50} d'environ 50 μ M ont été estimées sur une période de 24 h.

II. Inhibition de la biosynthèse du pABA par la rubreserine chez les plantes et les apicomplexes : conséquences pour la croissance des plantes et la prolifération des parasites

Dans ce chapitre nous analysons plus en détail l'effet de la rubreserine sur l'activité du domaine GAT de la GAT-ADCS, et précisons certains des paramètres biochimiques liés à cette inhibition. Ensuite nous évaluons l'impact de cet inhibiteur sur 1) la croissance des plantules d'*A. thaliana*, 2) l'invasion de fibroblastes humains par *T. gondii* et la prolifération de ces parasites dans les fibroblastes, et 3) la prolifération de *P. falciparum* dans des hématies. Les corrélations qui existent entre inhibition de la croissance et altération du métabolisme du folate ont été plus particulièrement étudiées chez *Arabidopsis* et *Toxoplasma*. Chez *Arabidopsis*, nous avons montré que la rubreserine diminue effectivement la concentration intracellulaire de folate, une diminution supprimée en présence de pABA. Chez les deux organismes, la présence de pABA ou de 5-formyl-THF dans le milieu de culture reverse en grande partie l'inhibition de croissance liée à la présence de rubreserine.

Ces travaux ont permis le dépôt d'un brevet auprès de l'office européen des brevets, en date du 04 mai 2011. Le texte de ce brevet est joint en annexe. L'ensemble de ce travail est le fruit d'une collaboration étroite entre plusieurs équipes, pour le dosage des folates (Université de Gent, Belgique), les expériences sur *Toxoplasma* (Université de Grenoble), celles sur *Plasmodium* (Université de Prétoria, Afrique du Sud) et celles sur *Arabidopsis* (Université de Grenoble). Je suis personnellement impliquée dans les expériences concernant les études d'enzymologie ainsi que celles concernant *A. thaliana* et *T. gondii*. Les résultats obtenus sont résumés dans le projet d'article qui suit. En attente de données complémentaires en provenance d'Afrique du Sud, ces travaux seront prochainement soumis pour publication.

Inhibition of *p*-aminobenzoate synthesis in plants and apicomplexan parasites

Djeneb Camara¹; Cordelia Bisanz²; Caroline Barette³; Jeroen Van Daele⁴; Esmare Human⁵; Bernadette Gambonnet¹; Dominique Van Der Straeten⁶; Christophe P. Stove⁴; Willy E. Lambert⁴; Roland Douce¹; Eric Maréchal¹; Lyn-Marie Birkholtz⁵; Marie-France Cesbron-Delauw²; Renaud Dumas¹ and Fabrice Rébeillé¹

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, CEA / CNRS UMR5168 / INRA USC1200 / Université Joseph Fourier Grenoble I, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble, France

²Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, CNRS UMR 5163 / Université Joseph Fourier Grenoble I, Institut Jean Roget, F-38042 Grenoble, France

³Centre de Criblage pour Molécules Bioactives, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble, France

⁴Laboratory of Toxicology, Ghent University, Harelbekestraat 72, B-9000 Ghent, Belgium

⁵Malaria Research Group, Department of Biochemistry, University of Pretoria, PO Box x20, Pretoria, South Africa, 0028

⁶Laboratory of Functional Plant Biology, Department of Physiology, Ghent University, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgium

Classification: Biological Sciences; Biochemistry

Correspondence:

Fabrice Rébeillé: PCV/iRTSV, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, F-38054 Grenoble, France

frebeille@cea.fr; Tel: 33 (0)4 38 78 44 93; Fax: 33 (0)4 38 78 50 91

Short title: Rubreserine inhibits plant growth and apicomplexan parasite proliferation.

Key words: pABA biosynthesis; GAT-ADCS; folate; Arabidopsis; apicomplexan;

Author contributions: D.J., Co.Bi., MF.CD., Ro.Do., E.M., Re.Du., and F.R. designed research; D.J., Co.Bi., Ca.Ba., J.V.D., E.H., B.G., D.V.D.S., C.P.S., W.E.L., L.M.B., and F.R. performed research; D.J., Co.Bi., MF.CD., Ro.Do., L.M.B., Re.Du., and F.R. analyzed data ; and Re.Du., and F.R. wrote the paper

The authors declare no conflict of interest

SUMMARY

Glutamine amidotransferase / aminodeoxychorismate synthase (GAT-ADCS) is involved in the synthesis of *p*-aminobenzoate (pABA), a central component part of folate cofactors. GAT-ADCS is found in eukaryotic organisms autonomous for folate biosynthesis, such as plants or parasites of the *Apicomplexa* phylum. Based on an automated screening to search for new inhibitors of folate biosynthesis, we found that rubreserine was able to inhibit the GAT activity of the plant GAT-ADCS with an apparent K_i of about 8 μM . The growth rates of *Arabidopsis thaliana*, *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, were inhibited by rubreserine with respective IC_{50} of about 65, 20 and 1 μM . The correlation between folate biosynthesis and growth inhibition was studied with *Arabidopsis* and *Toxoplasma*. The folate content measured in plants was decreased by 40 % in the presence of rubreserine, and the initial level was restored by pABA. In both organisms, the presence in the external medium of pABA or 5-formyltetrahydrofolate restored the growth activity. Rubreserine appeared to be more efficient than the antifolate drugs sulfonamides inhibiting the invasion and proliferation of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts. Altogether, these results validate the use of the bifunctional GAT-ADCS as an efficient drug target in eukaryotic cells, and indicate that the chemical structure of rubreserine represents a completely novel scaffold in the antifolate tool base, with promising anti-parasitic (toxoplasmosis, malaria) potential.

INTRODUCTION

Folates are a family of cofactors that are essential for cellular one-carbon (C1) transfer reactions. They are involved in several important metabolic pathways, such as the synthesis of nucleotides and the methylation cycle (1-3). Folate biosynthesis can be divided into three branches (Fig. 1A): the first one for the pterin ring synthesis, the second one for the pABA synthesis and the third one is involved in the assembly of these two precursors plus glutamates to form the backbone of folate derivatives (4-6). Blocking folate biosynthesis or turnover leads to the arrest of cell division and eventually to cell death. Antifolate drugs have been developed to exploit this feature in therapies against cancer cells and microbial or parasitic infections. Biosynthesis of folate is mainly inhibited by two groups of compounds, i.e. inhibitors of dihydropteroate synthase (DHPS) and inhibitors of dihydrofolate reductase (DHFR).

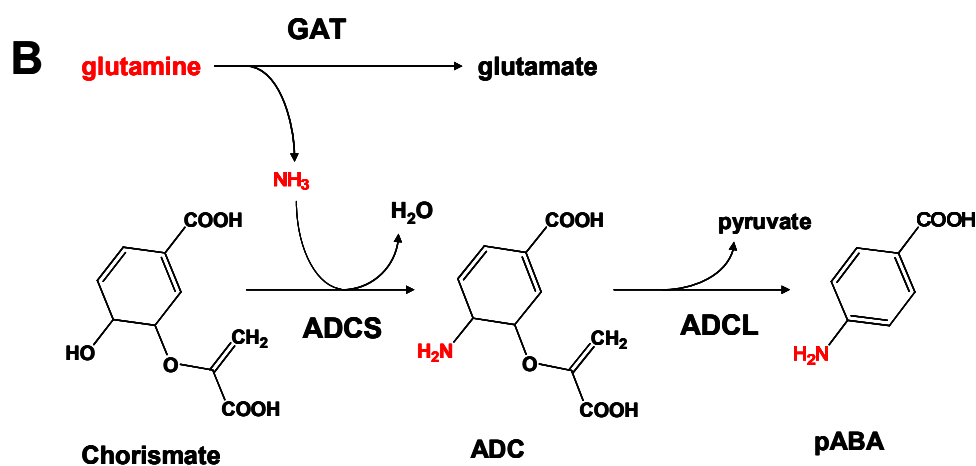
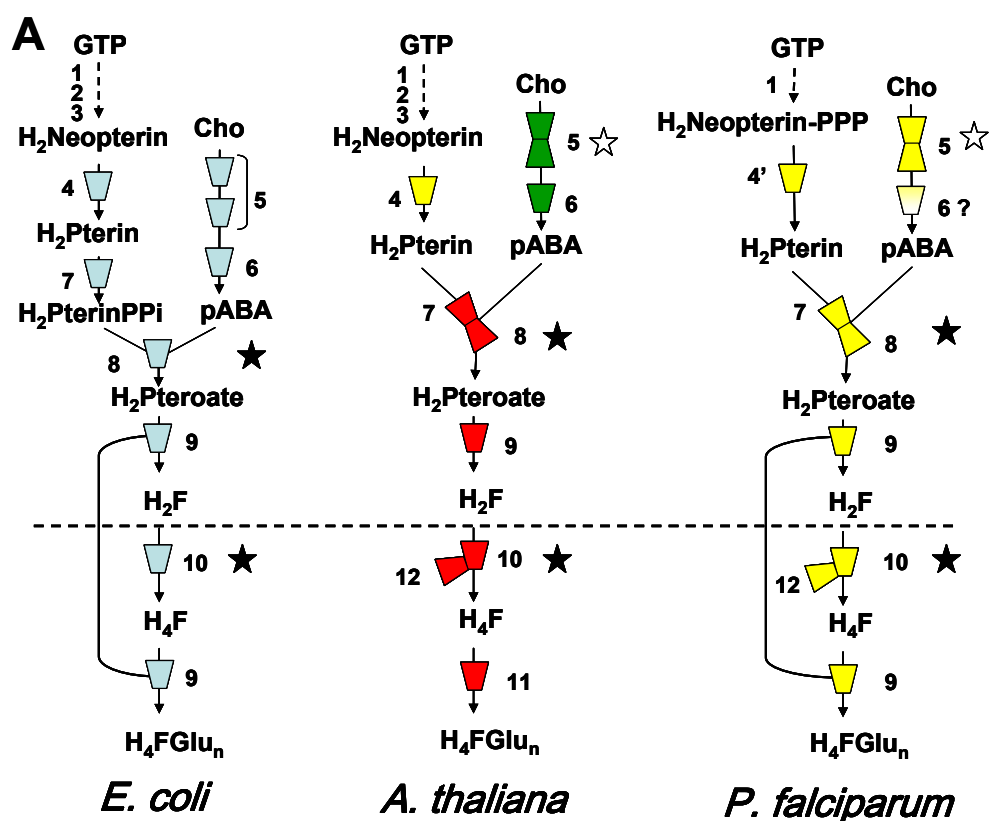


Figure 1: Biosynthesis of THF. A) Schematic representation of the pathways found in *E. coli*, *P. falciparum* and *A. thaliana*. The enzymes involved are: 1, GTP cyclohydrolase I; 2, NUDIXhydrolase; 3, unspecific phosphatase; 4, dihydroneopterin aldolase; 4', 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase; 5, glutamine amidotransferase (GAT) and aminodeoxychorismate synthase (ADCS) (PabA and PabB in *E. coli*); 6, ADC lyase (ADCL); 7, 6-hydroxymethyldihydropterin (H_2Pterin) pyrophosphokinase; 8, dihydropteroate ($\text{H}_2\text{Pteroate}$) synthase; 9, dihydrofolate (H_2F) synthase; 10, dihydrofolate reductase; 11, folylpolyglutamate synthase; 12, thymidylate synthase. Other abbreviations: Cho, chorismate; pABA, *p*-aminobenzoate; $\text{H}_2\text{PterinPP}$, 6-hydroxymethyldihydropterin pyrophosphate; H_4F , tetrahydrofolate; $\text{H}_4\text{F-Glu}_n$, the polyglutamylated form of H_4F . Enzymes in yellow are present in the cytosol, in green in the chloroplast, in red in the mitochondria. In *Plasmodium*, this is a putative localization, mainly based on sequence analysis. Merged symbols represent bifunctional enzymes. The activities 9 and 11 are catalyzed by a single enzyme in *E. coli* and *Plasmodium*. In *Plasmodium*, the

activity 6 remains to be identified. Above the broken line, the activities are absent in animals. The black stars show the two enzymes actually targeted by antifolate drugs. The white stars show the potential target studied in the present paper. B) Details of the two steps pathway required for pABA synthesis. In all eukaryotes the first step involves a bifunctional GAT-ADCS, whereas two separate proteins PabA and PabB are found in most (but not all) prokaryotes (18).

Inhibitors of DHFR are commonly used as therapeutic agents against cancer (7) whereas a combination of these two types of inhibitors are most often used in clinical treatments against parasites from the *Apicomplexa* phylum such as *Plasmodium falciparum* or *Toxoplasma gondii* (8, 9). However, the use of these drugs is compromised by the emergence of resistance, and the currently used chemical scaffolds and protein targets are actually over-exploited. Nevertheless, the long-established efficacy of folate metabolism as a clinical target is strongly encouraging to identify new inhibitors efficient against other enzymes of the folate pathway comprising a further nine enzyme activities in addition to DHPS and DHFR (Fig. 1A) (10-12).

Among potential targets, the enzymes involved in the pABA branch of the pathway are of great interest (13). Indeed, they are absent in animals and the only known metabolic fate of pABA is its commitment in folate synthesis. In addition, it was recently shown in plants that the production of pABA, together with the production of pterins, is rate limiting for the whole folate pathway (4, 5). The pABA moiety is synthesized in two steps from chorismate [a metabolite also involved in aromatic amino acid synthesis (14)]. First, chorismate is aminated to form 4-amino-4-deoxychorismate (ADC), and then ADC is aromatized with loss of pyruvate (Fig. 1B). In bacteria such as *E. coli* or *B. subtilis*, ADC synthesis requires two separate proteins: PabA (a glutamine amidotransferase) and PabB (the ADC synthase) (15). In eukaryotes, the situation appears different. Indeed, in plants and lower eukaryotes, such as yeast and *Apicomplexa*, ADC synthesis is catalyzed by a single bifunctional protein (Fig. 1A) containing two domains, the glutamine amidotransferase (GAT) in the N-terminal part and the ADC synthase (ADCS) in the C-terminus (16). Based on sequence similarities with TrpG (the component II of anthranilate synthase), GAT-ADCS is classified as a member of the G-type group of amidotransferases (17, 18). There is only one gene coding for GAT-ADCS in apicomplexan parasites and plants, and a mutation in the plant gene is embryo defective. The ADCS domain belongs to the group of chorismate-utilizing enzymes, which also contains salicylate synthase, isochorismate synthase and anthranilate synthase (19, 20). Until now, searches of inhibitors for this class of enzymes were only done with prokaryotic systems. They involved docking studies and design of chorismate analogous compounds (21-24), combinatorial chemistry approaches (25, 26), and a specific screening of a microorganism

extract collection using growth inhibition of test bacteria as a marker of activity (27, 28). Several compounds were identified by these different methods but appeared to be relatively weak inhibitors of ADCS, although some of them could be quite potent against other chorismate-utilizing enzymes (21-23, 25). The most potent inhibitor of ADCS reported to date is an analogue of chorismate (2-hydroxy-4-amino-4-deoxychorismate), exhibiting a K_i value of 38 μM against the purified enzyme (22). To our knowledge, the *in vivo* effects of these ADCS inhibitors have not been investigated.

In the present report, using a purified recombinant plant GAT-ADCS as a model enzyme for bifunctional GAT-ADCS, we screened a chemical library to search for new inhibitors of pABA synthesis. We identified one compound having a $K_i < 10 \mu\text{M}$ and measured the *in vivo* impact of this molecule on a plant (*Arabidopsis thaliana*) and the *in vitro* effect on two apicomplexan parasites (*T. gondii* and *P. falciparum*).

RESULTS

GAT-ADCS assay, high throughput screening and GAT-ADCS inhibition

The search for enzyme inhibitors by global approaches requires methods to determine the activity that are accurate, robust and compatible with the automated platforms used for screening of chemical libraries. When coupled with glutamate dehydrogenase (GDH), GAT activity was easily measurable with a UV-visible spectrophotometer (340 nm) or a fluorimeter (excitation 340 nm, emission 450 nm) monitoring NADH accumulation (18, 29). Also, it was convenient to use the same procedure to test the inhibitors on GDH alone, in order to discard the molecules that were specific for this last activity. Based on this protocol, we designed a miniature assay easily reproducible and optimized for the identification of active drugs, with a screening coefficient Z' [a statistical parameter measuring the quality of the screening assay (30)] comprised between 0.68 and 0.84 (see Material and Methods). Because all our attempts to produce active recombinant *Tg*GAT-ADCS and *Pf*GAT-ADCS failed, we used the recombinant plant enzyme as a model for this bifunctional system. We screened the registered Prestwick[®] Chemical Library (1200 compounds) against the GAT activity of the plant GAT-ADCS. Based on this screening, we found that rubreserine (1,3a,8-trimethyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indole-5,6-dione), an oxidative product of eseroline (31-33) that spontaneously forms at alkaline pH (Fig. 2 and Fig. S1 in Supporting Information), exhibited inhibitory properties. Eseroline itself had no effect, indicating that the carbonyl functions resulting from eseroline oxidation were essential for the inhibition.

coupled with non limiting amounts of ADC lyase (Fig. 3A, 3B). In separate control experiments we verified that rubreserine did not impact ADC lyase activity. In all situations, rubreserine decreased the V_m and increased the K_m for glutamine, indicating a mixed-type inhibition (Fig. 3C). Apparent equilibrium constants K_i (representing the ratio $[E][I]/[EI]$) and αK_i , (representing the ratio $[ES][I]/[ESI]$) calculated from such pattern of curves (34) were estimated to be respectively 3 ± 1 and 8 ± 1 μM in the different conditions, i.e. measuring either glutamate or pABA productions.

In vivo effects of rubreserine on Arabidopsis thaliana growth and folate content

When *Arabidopsis* seedlings were grown on agar plates in the presence of rubreserine concentrations ranging from 50 to 100 μM , we observed a dose-dependent growth inhibition (Fig. 4).

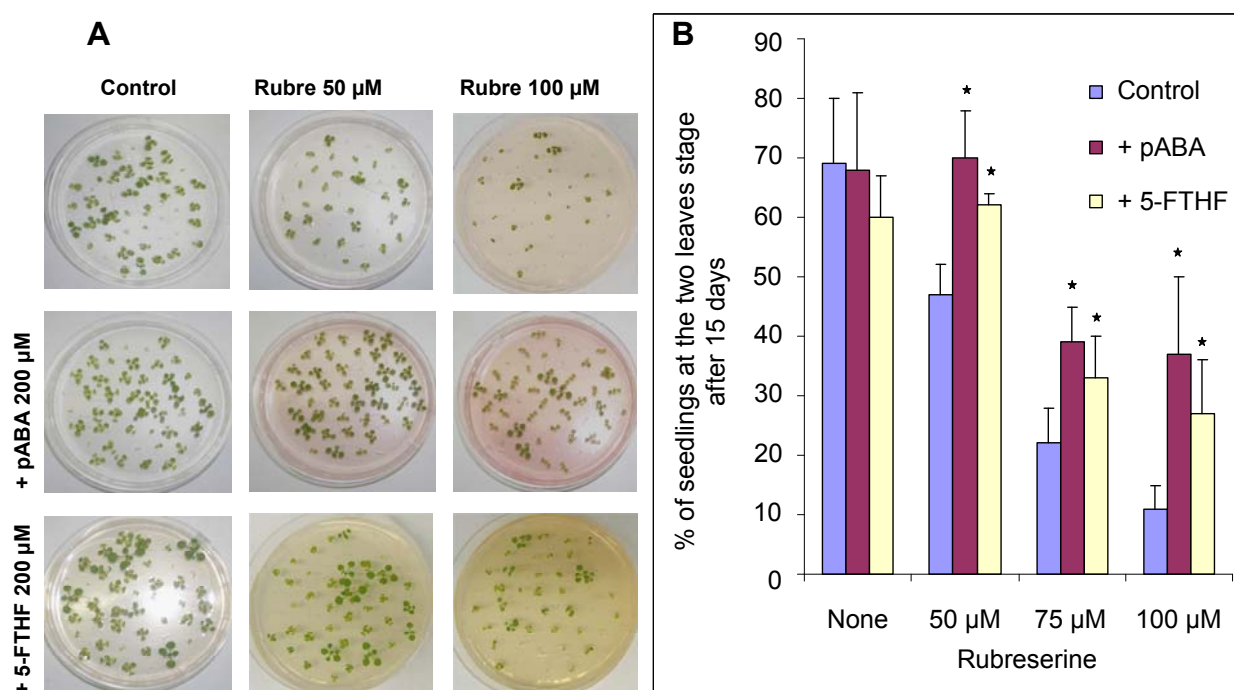


Figure 4: Effect of rubreserine on the development of *Arabidopsis* seedlings. A) Representative experiments showing 2 week old seedlings grown in agar plates without (control) or with 50 or 100 μM rubreserine. The presence in the culture medium of 200 μM pABA or 200 μM 5-formyltetrahydrofolate (5-FTHF) partially reversed the growth inhibition. B) Histogram is representing the estimated number of seedlings at the rosette stage after 2 weeks. Results are the average of at least three independent experiments \pm SD. Asterisks mark datasets showing statistical difference with the corresponding control in a Student's T-test ($p < 0.05$).

Interestingly, when the agar plates were supplemented with pABA, the inhibition was suppressed or partially suppressed, the maximal effect being obtained with pABA

concentrations $\geq 100 \mu\text{M}$ (Fig. 4). This suggests that the growth inhibition observed in the presence of rubreserine was, at least partly, due to a limitation of pABA synthesis. Because pABA is required for folate biosynthesis, we also measured the potential impact of 5-formyl tetrahydrofolate (5-FTHF) on rubreserine-treated plants (Fig. 4). As shown, this folate derivative had similar effect than pABA.

Next, we investigated the effect of rubreserine on the folate content. We used cell cultures for these experiments to dispose of sufficient amount of material for metabolite determinations. For rubreserine concentrations within the range 25 - 100 μM , the cell division came to an arrest after about seven days (data not shown). Similar results were obtained in the presence of sulfanilamide, a well known specific inhibitor of DHPS that blocks pABA utilization in the folate pathway (Fig. 1A). After seven days, the pools of folate in rubreserine- and sulfanilamide-treated cells (Table I) decreased by about 40 and 60 %, respectively. Interestingly, when 100 μM pABA were present in the culture medium, the folate content in both control and rubreserine-treated cells were almost identical (Table I), which is clearly indicative of a protective effect of pABA. Since rubreserine inhibits the pABA branch of the folate pathway, we also attempted to measure the pABA content of *Arabidopsis* cells. In plants, pABA is found either as free acid or as a glucose ester conjugate. This last form (> 80 % of total pABA) is sequestered in vacuoles and does not directly contribute to folate synthesis (35, 36). This makes the determination of free pABA quite difficult because, as previously shown (35), breakdown of the esterified form of folate during sample workup is very difficult to avoid and contributes, sometimes quite significantly, to the amount of free pABA. In the presence of 100 μM rubreserine, we however observed a small but significant decrease of free pABA by about 30 % (Table II). In contrast, the total amount of pABA did not markedly change, suggesting that the glucose ester conjugate in the vacuole and the free acid form in the cytosol are not in rapid equilibrium. In sulfanilamide-treated cells, free and total pABA slightly increased by about 30 % (Table II), an expected result taking into account that pABA utilization was blocked (37).

Table I

Effect of rubreserine (Rubre) on the folate content of *Arabidopsis* cells, and comparison with sulfanilamide (Sulfa). Cells were cultivated for 7 days with the various compounds before folate determinations. The total folate contents of control cells cultivated with or without 100 μM pABA were respectively 11.8 ± 2 and 10 ± 1.5 nmoles g^{-1} fresh weight. Measurements are the average \pm SD of 4 to 6 determinations from 2 to 3 independent set of experiments. Results for each set of experiment are expressed as % versus the corresponding control.

Conditions	Total folates (% versus control)
Rubre 25 μM	60 ± 10
Rubre 25 μM + pABA 100 μM	85 ± 9
Rubre 50 μM	66 ± 3
Rubre 50 μM + pABA 100 μM	116 ± 12
Rubre 100 μM	54 ± 9
Sulfa 25 μM	42 ± 3
Sulfa 100 μM	39 ± 6

Table II

Effect of rubreserine (Rubre) on the pABA contents of *Arabidopsis* cells, and comparison with sulfanilamide (Sulfa). Cells were cultivated for 7 days with the various compounds before pABA determination. The total and free pABA concentrations found in control cells were respectively 8.5 ± 2 and 1.1 ± 0.4 nmoles g^{-1} fresh weight. Measurements are the average \pm SD of 8 determinations from 4 sets of experiments. Results for each set of experiments are expressed as % versus the corresponding control.

Conditions	pABA (% versus control)	
	Total	Free
Rubre 100 μM	90 ± 5	73 ± 8
Sulfa 100 μM	128 ± 16	132 ± 18

Effect of rubreserine on the proliferation of apicomplexan parasites

Before to test the effect of rubreserine on *Toxoplasma gondii*, we first verified with the MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] cytotoxicity assay (38) that

rubreserine concentrations up to 50 μM had no toxicity on confluent human fibroblast (HFF) cells. Indeed, after 48 h of exposure to 50 μM rubreserine, the cell viability was still $95 \pm 5\%$ of the control. We subsequently evaluated the effect of rubreserine on *Toxoplasma* parasites in two situations: i) invasion of confluent HFF, and ii) intracellular development of the parasites within confluent HFF. As shown in figure 5A, invasion of human cells strongly decreased when the parasites have been previously incubated with rubreserine. This effect was dose-dependent, the number of intracellular parasites being reduced two fold in the presence of 20 μM rubreserine (IC_{50}). Likewise, when infected cells were placed in the presence of the inhibitor, the number of parasites in parasitophorous vacuoles decreased after 24 h, which was representative of a slowing down of the parasite's intracellular division (Fig. 5B).

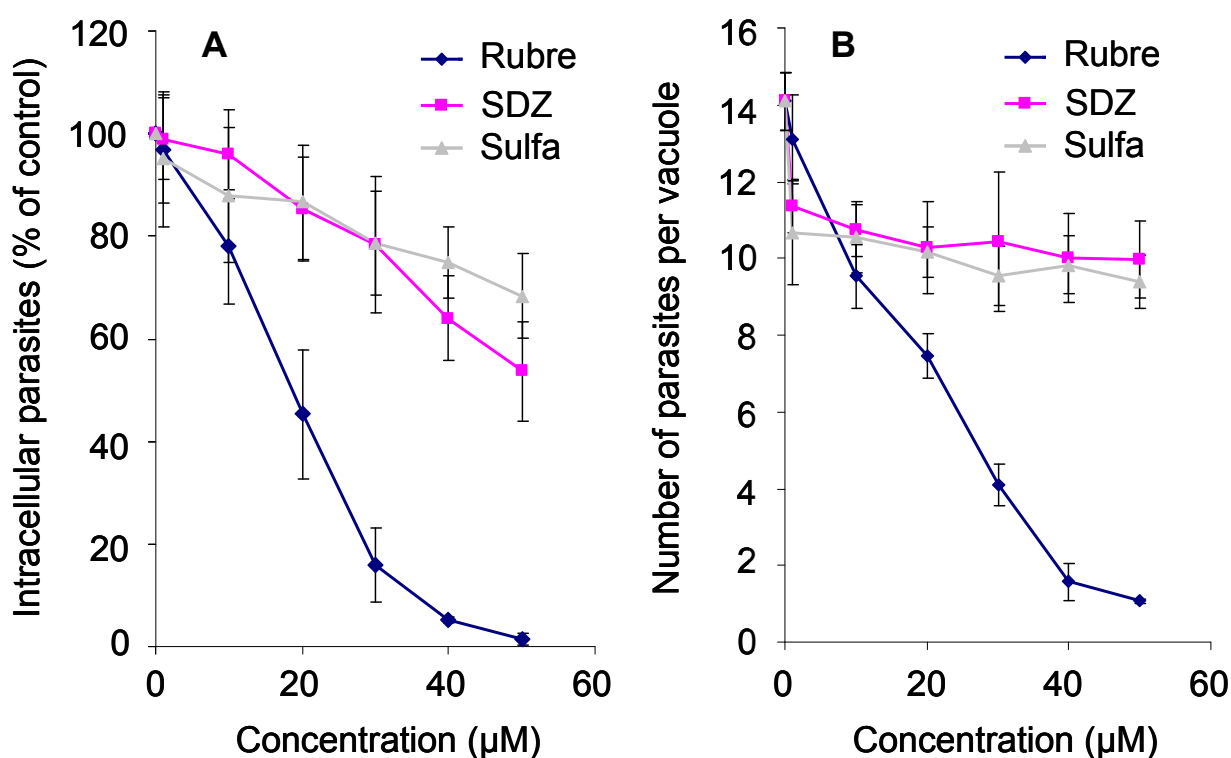


Figure 5: Effect of rubreserine (Rubre) on the invasion and proliferation processes of *T. gondii*, and comparison with sulfanilamide (Sulfa) and sulfadiazine (SDZ). A) Invasion of human fibroblasts. The parasites were first incubated with the various drugs for 5h, and then placed in contact with HFF cells for 15 min. The number of intracellular parasites is expressed for each experiment as % of the number recorded in non-treated cells. B) Intracellular growth of the parasites. Intracellular proliferation was estimated 24 h after the invasion process and expressed as the number of parasites present in the parasitophorous vacuoles. Results from invasion and proliferation experiments are the average of three to four independent experiments \pm SD.

In both situations, rubreserine appeared much more efficient than sulfanilamide and sulfadiazine, this last sulfonamide drug being widely used against toxoplasmosis. The inhibition of the parasite growth was significantly reduced in the presence of either pABA or 5-FTHF (Fig. 6A, 6B), the maximal protective effect being obtained for concentrations ≥ 50 μ M. This indicates that the inhibitory process largely relied on the inhibition of pABA and folate biosynthesis. Since antifolate drugs (anti DHPS and anti DHFR) are often used in combination, we tested the effect of rubreserine in combination with an anti DHFR. When 20 μ M rubreserine and 0.4 μ M pyrimethamine were combined, the inhibition was further increased compared to rubreserine alone (Fig. 6B). Interestingly, rubreserine alone appeared as much efficient as a mixture combining 50 μ M sulfadiazine and 0.4 μ M pyrimethamine.

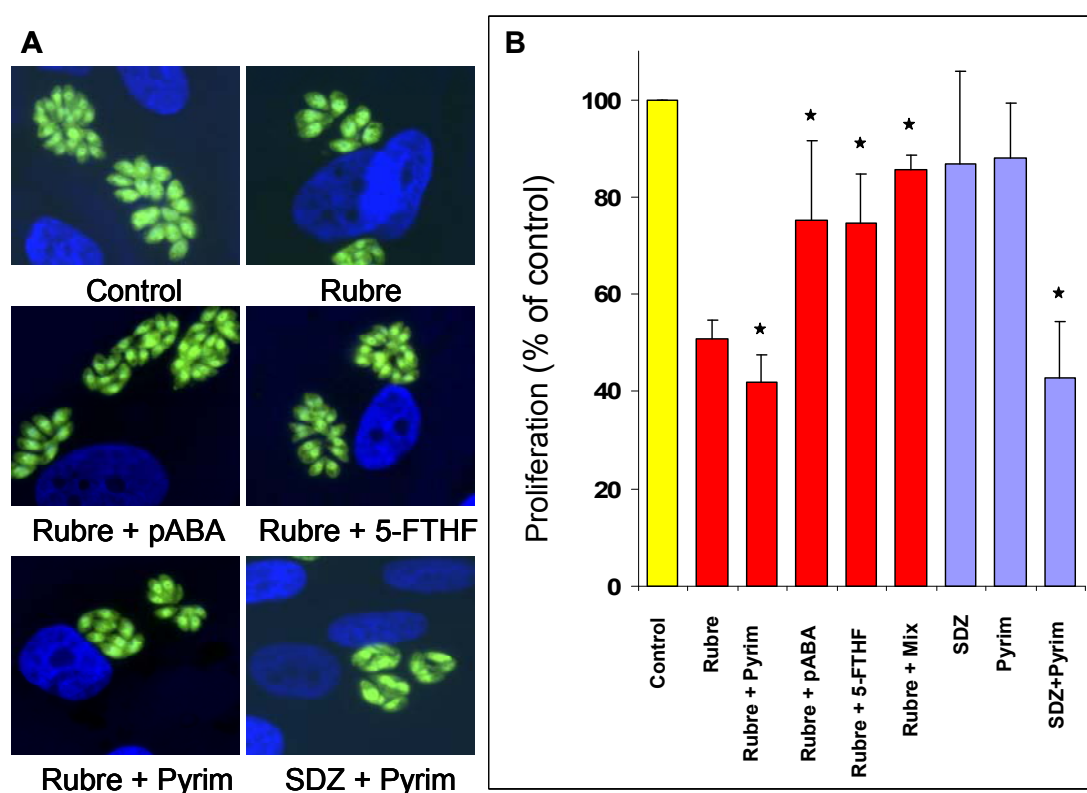


Figure 6: Effect of rubreserine in combination with various other compounds on the proliferation of *T. gondii*. The concentrations used were: 20 μ M rubreserine (Rubre), 0.4 μ M pyrimethamine (Pyrim), 100 μ M pABA, 100 μ M 5-formyltetrahydrofolate (5-FTHF), 50 μ M sulfadiazine (SDZ). Mix is a mixture containing pABA, anthranilate, UMP and GMP, 50 μ M each. A) Representative pictures showing in blue the nuclei of fibroblast cells and in green the parasites in the parasitophorous vacuoles after 24 h (proliferation assay). B) Number of parasites present in the parasitophorous vacuoles after 24 h. They are expressed as % versus the corresponding controls (i.e. no adds, or pABA alone, or 5-FTHF alone). Results are the average of four independent experiments \pm SD for the effect of rubreserine alone or in combination with pABA and 5-FTHF, and three independent experiments for the other conditions. Asterisks indicate statistical difference in a Student's T-test ($p < 0.05$) between

the conditions rubreserine alone and rubreserine in combination with other drugs, and between the conditions sulfadiazine or pyrimethamine and sulfadiazine plus pyriméthamine.

Additionally, Rubreserine was also tested on the *in vitro* proliferation of *P. falciparum*. As shown on Figure 7, rubreserine exhibited anti-malarial properties, since the intraerythrocytic growth of the parasite was strongly inhibited by rubreserine, with an IC₅₀ of $1 \pm 0.04 \mu\text{M}$ (n=5).

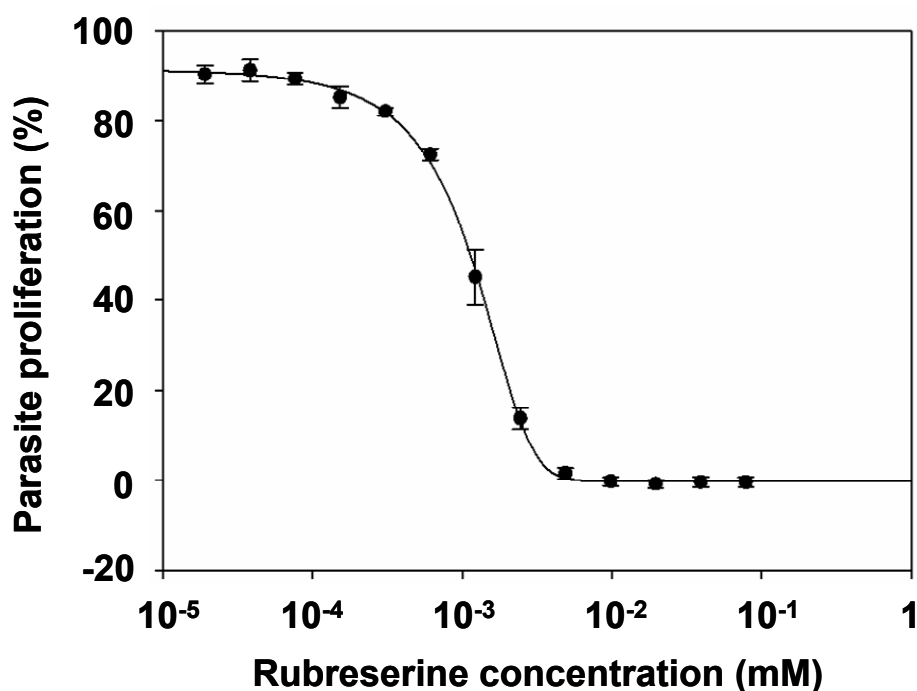


Figure 7: Effect of rubreserine on the growth of *P. falciparum*. Parasites were maintained under normal culture conditions and exposed to serial dilutions of rubreserine from 10 mM and parasite proliferation determined as a measurement of DNA content with SYBR Green I fluorescence after 96 h of exposure. Data are averaged from 5 independent experiments performed in triplicate (\pm S.E.).

Specificity of inhibition by rubreserine

Although folate biosynthesis appeared as a main target, the question of the specificity of rubreserine must be raised. GAT-ADCS belongs to the family of glutamine amidotransferases, a class of enzymes that incorporate nitrogen from glutamine into a variety of metabolites. Based on sequence similarities with TrpG [the component II of anthranilate synthase (AS)], GAT-ADCS is classified as a member of the G-type group of amidotransferases (17). Thus, we determined the effect of rubreserine on two other members of this group. We produced for these assays two recombinant *Arabidopsis* proteins: AS [a heterodimeric protein combining the activities of β - and α -subunits, respectively equivalent to TrpG and TrpE in prokaryotes (39)] and GMP synthase (GMPS) [a bifunctional enzyme with

fused GAT and synthase domains (40)]. Indeed, although the GAT domain of GAT-ADCS does not share strong homologies with other glutamine amidotransferases, it shows the highest similarity (about 28 % identity) with the β -subunit of AS. GAT domains from GAT-ADCS and GMPS display even less homology (13 % identity) but both enzymes exhibit fused GAT and synthase domains. We used for these experiments the same GDH-coupled assay that we used for GAT-ADCS. As shown in Table III, rubreserine also inhibited GMPS and AS activities, although inhibition of GMPS required higher concentrations of inhibitors.

Table III

Effect of rubreserine on the GAT activities associated with recombinant *Arabidopsis* GAT-GMPS, AS and GAT-ADCS. Activities were estimated measuring the glutamate production through a GDH coupled assay, as described in Material and Methods. Rubreserine concentrations up to 50 μ M had no detectable effect on GDH activity alone. Assays were made in triplicate and expressed \pm SD.

Enzymes	Specific Activities (μ moles min^{-1} mg^{-1})	IC ₅₀ (μ M)
<i>At</i> GAT-GMPS	0.30	25 \pm 10
<i>At</i> AS (α + β subunits)	0.16	7 \pm 2
<i>At</i> GAT-ADCS	0.40	8 \pm 2
GDH (type II from bovine liver)	44	Not measurable: \gg 50

In *Toxoplasma* there is no AS activity and the parasite is auxotroph for tryptophan (41). The situation is less clear in *Plasmodium*: the parasite did not appear to be auxotroph for tryptophan (42), but the AS genes are not yet identified in the genomic data bank. Other enzymes of the G-type amidotransferases, in particular those involved in pathways required for the synthesis of GMP [GMPS, a bifunctional enzyme, alike to plants (43)] and UMP [carbamoyl phosphate synthetase II, a heterodimer in plants (44) but a single protein in apicomplexan parasites (45)] are present in these organisms. When a mixture containing pABA, anthranilate, UMP and GMP (100 μ M each) was added to the culture medium of rubreserine-treated plants or was present in the proliferation assay of *Toxoplasma*, the growth recovery for both organisms was not markedly improved compared to the one obtained with pABA alone (see Fig. 6 for the experiments with *T. gondii*). These results suggest that inhibition of these other potential targets contribute little to the observed growth inhibitions, at least for the rubreserine concentrations used in these assays.

DISCUSSION

Two main conclusions can be drawn from this study: first, our data validate for the first time the use of the bifunctional GAT-ADCS as an efficient drug target in eukaryotic cells, and, second, we identified a new scaffold with antifolate properties that inhibits plant growth and proliferation of apicomplexan parasites.

The screening test we used appeared efficient to select active compounds from Prestwick[®] chemical library, and we found that an oxidative product of eseroline, rubreserine, was inhibiting the GAT activity of *At*GAT-ADCS. Eseroline and rubreserine were identified a long time ago as metabolites of physostigmine (eserine), an alkaloid previously used for its potent anticholinesterase activity. Although pharmacological studies indicated that the two former molecules were not or weak inhibitors of cholinesterase (46) there was no report indicating that rubreserine could affect folate biosynthesis and inhibit the growth of plants and the proliferation of parasites. Thus, we describe for this compound a new biological effect with interesting therapeutic potentialities.

When GAT-ADCS was coupled with ADC lyase, the apparent constant of inhibition (K_i) for pABA formation was estimated to be $< 10 \mu\text{M}$, which is the best constant of inhibition obtained so far for the biosynthesis of pABA. How rubreserine affects the protein activity is however not yet understood, and currently under investigation. The obvious difference between the chemical structures of eseroline and rubreserine is the presence on the aromatic ring of the latter of two carbonyl functions. Thus, these carbonyl functions were presumably at the origin of the inhibitory effect. Quinonoid compounds, such as *o*-diquinones, are indeed reactive electrophilic molecules that could covalently modify a variety of nucleophile groups, including thiol, amine or amide residues of amino acids (47). From this point of view, it is interesting to note that rubreserine was also able to inhibit other GAT-dependent activities *in vitro*.

Although rubreserine might also inhibit other enzyme activities, the *in vivo* observed effects on *Arabidopsis* and *Toxoplasma* were at least partly associated with an inhibition of folate biosynthesis. The correlation between rubreserine and folate biosynthesis was observed by direct and indirect approaches. The direct approach was done with plant cells: grown in the presence of $100 \mu\text{M}$ rubreserine, *Arabidopsis* cells exhibited folate and free pABA contents lowered respectively by 45 % and 25 %. In addition, when pABA was present in the culture medium of rubreserine-treated cells, the folate levels in treated and non-treated cells were almost identical, indicating a protective role of pABA. The impact of rubreserine on folate

biosynthesis was also shown indirectly. Indeed, the fact that rubreserine-dependent growth inhibitions of *Arabidopsis* and *Toxoplasma* were, for a large part, reversed by the addition of pABA or 5-FTHF indicates that the biosynthesis of pABA displayed a particular sensitivity to rubreserine, and that the resulting decrease of folate biosynthesis contributed to the inhibitory process.

The IC₅₀ obtained with the living organisms used in this study were approximately 60 µM, 20 µM and 1 µM for *Arabidopsis*, *Toxoplasma* and *Plasmodium*, respectively. These differences might reflect variable susceptibilities between the GAT-ADCS of the different organisms, or variable ability for rubreserine to cross the various cell membranes. From this point of view, it must be kept in mind that GAT-ADCS in plants is located in plastids whereas it is located in the cytosol of apicomplexans. Thus, in plants, rubreserine had to cross the cell wall, the plasmalemma and the two membranes of the plastids envelope before to reach the target. It is interesting to compare the effects of GAT-ADCS and DHPS inhibitors because both types of drugs impact pABA metabolism. Interestingly, rubreserine appeared much more efficient against *Toxoplasma gondii* than sulfadiazine, a sulfonamide widely used for the treatment of severe toxoplasmosis. Indeed, the IC₅₀ value calculated for rubreserine was significantly lower than the IC₅₀ for sulfadiazine estimated from this study (> 50 µM). The IC₅₀ for sulfadiazine may fluctuate widely depending of the strain, from about 20 µM to more than 200 µM, and is generally > 30 µM (48). Such a variation presumably illustrates the occurrence of resistance within the numerous *Toxoplasma* strains. Sulfonamide drugs are normally not used alone against parasites of the *Apicomplexa* phylum because of their limited activity (8). However, they are potent synergizers of DHFR inhibitors, which is the reason why these molecules are used in combination. Indeed, inhibition of DHPS decreases the *de novo* synthesis of dihydropteroate, which, in turn, leads to reduction of dihydrofolate, the substrate of DHFR. Because the amount of dihydrofolate is decreased, the efficiency of DHFR inhibitors increases and lower doses of these toxic molecules are required. When used in combination with pyrimethamine, rubreserine appeared as much efficient as a mixture combining sulfadiazine and pyrimethamine. Thus, molecules with a hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole-5,6-dione skeleton, such as rubreserine, could be interesting structures to develop new antifolate drugs that could represent alternatives to sulfonamides.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia) seedlings were grown on plates containing Murashige and Skoog medium, 15 % agar, plus the various molecules to be tested. Seeds were first sterilized by soaking for 15 min in a solution containing 0,095 % Tween and 0,57 % sodium hypochlorite before to be laid on the agar medium. The plates were conserved in the dark at 4 °C for 48 hours then transferred in a green house (20 °C, 80 % humidity, 150 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 12 h light period). The number of seedlings at the two leaf stage (rosette stage) was counted after 2 weeks.

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia) cell suspension cultures were grown and sub cultured as previously described (49). For measurements of metabolites, cells were collected after 7 days of treatment, rapidly washed with distilled water, weighted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for later analyses.

Toxoplasma gondii tachyzoites from the RH-YFP₂ strain (kindly provided by B. Striepen, Athens) were propagated in human foreskin fibroblasts (HFFs) under standard procedures as previously described (50). For invasion and proliferation assays HFF cells were grown to confluence on glass coverslips in 4 or 24 multiwell plates.

For the invasion assay, freshly egressed RH-YFP₂ parasites were incubated for 5 hours with the different drugs. Then 10⁶ parasites/well were centrifuged for 30 sec at 1300 rpm on HFF monolayers to synchronize invasion and wells were incubated for 15 min in a water bath at 37 °C. Wells were washed three times with cold PBS to eliminate extracellular parasites and cells were fixed in 5 % formaldehyde/PBS for 30 min and stored in PBS at 4 °C until staining. To distinguish intracellular from extracellular parasites, HFF cells were incubated with the primary antibody mAb Tg05-54 to detect the major *Toxoplasma* surface protein SAG1 (TgSAG1), then with Texas Red-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes). Intracellular parasites exhibit a faint red colour and can easily be distinguished from extracellular parasites which are bright red. Nuclei were stained with Hoechst 33258 (Molecular Probes). To determine the number of intracellular parasites, 12 randomly selected fields were counted per well and per experiment with a Zeiss Axioplan 2 microscope equipped for epifluorescence and phase-contrast. Invasion was expressed as % of the number of intracellular parasites recorded in non-treated cells.

To assess the effect of the drugs on intracellular growth of *T. gondii* (proliferation assay), 10⁵ parasites/well were centrifuged on HFF monolayers for 30 sec at 1300 rpm and incubated for 15 min in a water bath at 37 °C for invasion. Wells were then washed three times with PBS to eliminate extracellular parasites and drugs were added. After 24 hours at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂, cells were fixed and stained with Hoechst 33258

as described above. For each drug concentration, the number of parasites was determined from 100 to 200 individual vacuoles.

Plasmodium falciparum

Plasmodium falciparum (3D7) was maintained in human O⁺ erythrocytes as previously described (51). The *in vitro* anti-plasmodial activity of the rubreserine was determined using the malaria SYBR Green I fluorescence assay as has been described (52, 53). *In vitro* ring-stage intra-erythrocytic *P. falciparum* parasites (1% haematocrit, 1% parasitaemia) were incubated with specific concentrations of rubreserine in complete *P. falciparum* culture medium, with chloroquine disulphate used as a positive control (0.5 μ M) or vehicle (1xPBS) as negative control. Fluorescence was measured after 96 h under drug pressure (excitation 485 nm, emission 538 nm). The data, after subtraction of background (chloroquine disulphate treated iRBCs, no parasite growth) were expressed as percentage of untreated control to determine cell proliferation.

Rubreserine preparation

Rubreserine was prepared from (-)-eseroline fumarate salt (Sigma). Stock solutions of eseroline (10 mM) were made in 50 mM Pi (pH 8), 50 mM Tris (pH 8) or 1 x PBS (pH 7.5) buffers, depending on the experiments. Under these conditions, eseroline is spontaneously oxidized into rubreserine, a process completed in about 6 hours at room temperature. The formation of rubreserine was controlled through the appearance of a characteristic peak of absorption at 475 nm. These stock solutions were stored at 4 °C for 48h or at -20 °C for one week. They were serially diluted before use.

Expression and purification of the recombinant *Arabidopsis* enzymes

AtGAT-ADCS and *EcADCL* proteins were expressed and purified as previously described (18). *Arabidopsis* cDNAs encoding GMPS, β -subunit of AS starting at A51 to remove the plastid transit peptide, and α -subunit of AS starting at A61 were amplified by PCR and cloned into the expression vector pET28 (Novagen). *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL cells (Stratagene) were transformed and grown using the same protocol than for *AtGAT-ADCS*. Cells were disrupted and His-tagged recombinant proteins were purified as described (18).

Determination of enzyme activities

GAT activity can be determined by measuring the production of glutamate, and ADCS activity by the production of pABA (18). Standard assays contained 100 mM Tris/HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 5 % V/V glycerol, 0 to 0.5 mM L-glutamine, 0 to 0.02 mM chorismate,

and 9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of the recombinant plant enzyme. The presence of an excess of EcADCL (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 600 nM) is required for the production of pABA. Reactions (final volume 80 μl) were run in the wells of a 96 well microplate (Greiner) and changes in fluorescence were continuously monitored with a microplate scanning spectrophotometer Safir² (Tecan). To monitor glutamate production, an excess of GDH (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 4.2 units ml^{-1}) and 1 mM NAD were added to the assay, and NADH production was followed by its emission at 450 nm (excitation 340 nm). Concentration of pABA was monitored by its fluorescence emission at 340 nm (excitation 290 nm) in the presence of EcADCL.

The activities of GMPS and AS (β - plus α -subunits) were measured monitoring glutamate production. In both conditions the final volume was 500 μl . For GMPS, the assay medium contained: 200 μM XMP, 1 mM ATP, 0.5 mM L-glutamine, 10 μg GMPS, 1 mM NAD, 4.2 units ml^{-1} GDH. For AS, the assay medium contained: 50 μM chorismate, 0.5 mM L-glutamine, 10 μg TrpG, 10 μg TrpE, 1 mM NAD, 4.2 units ml^{-1} GDH and various concentrations of rubreserine. The reactions were started by addition of glutamine and the change in absorbance at 340 nm was monitored with a UV-visible spectrophotometer (Safas).

High throughput screening

The screening was conducted at the Centre for the screening for Bio-Active Molecules (CMBA) located at the CEA-Grenoble, France. The library of compounds was purchased from The Prestwick Chemical Library[®]. This library contains 1200 molecules, 100 % being marketed drugs, supplied at a 5 mM concentration in DMSO. The final concentration used in the enzymatic assay was 100 μM , and we verified in separate control experiments that 2 % DMSO had no effect on the activity. The enzymatic test used for primary and secondary screenings was identical to the one described above for the GAT activity. Quality of the assay was assessed based on the calculation of the Z' factor, as defined by Zhang et al. (30). After optimization of the assay, the Z' factor was comprised between 0.68 and 0.84 (a good assay must display a Z' factor > 0.5). The assay was conducted as follows: 50 μl of a mix containing 0.1 M Tris (pH 8), 5 mM MgCl_2 , 5 % glycerol, 40 μM chorismate, 1 mM NAD, 0.4 unit GDH, 0.7 μg GAT-ADCS and 100 μM of the various molecules were added in each well (in control wells, molecules were omitted). The reaction was started by injection in each well of 30 μl of a solution containing 1.3 mM Gln, and the fluorescence changes (Exc 340 nm, Emi 450 nm) were recorded at 0, 15 and 25 min. The most promising molecules were purchased and their inhibitory properties were manually confirmed.

Measurements of metabolites

Determinations of folates and pABA were essentially performed as described before (54-56). Briefly, following extraction of 0.5 g of plant material, including deconjugation, the extract was subjected to separation using UPLC (for folates) or HPLC (for pABA), followed by tandem mass spectrometric detection on an Applied Biosystems API 4000 (Foster City, CA, USA), using electrospray ionization, in the MRM mode. For folates, the final quantitative data reflect the sum of six different folate monoglutamates: 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF), 10-formylfolic acid (10-CHOFA), 5,10-methenyltetrahydrofolate (5,10-CH+THF), folic acid (FA), tetrahydrofolate (THF) and 5-formyltetrahydrofolate (5-CHOTHF). [¹³C]-folate derivatives and 3-NH₂-4-CH₃-benzoic acid were added in the extraction buffers as internal standards for respectively folates and pABA.

ACKNOWLEDGMENTS

This work and the Ph.D. fellowship of D.C. were supported by the Région Rhône-Alpes (Cluster 9, 'Plantacter'). D.V.D.S. and W.L. thank Ghent University for financial support (BOF09-GOA-004). We wish to thank Dr Céline Richefeu-Contesto for helpful discussions and Drs Stéphane Ravanel and Claude Alban for critical reading of the manuscript.

A patent was registered in the European Patent Office: patent number 11290215.0 - 1211

REFERENCES

1. Rébeillé F, *et al.* (2006) Folates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiol Plant* 126(3):330-342.
2. Blancquaert D, *et al.* (2010) Folates and Folic Acid: From Fundamental Research Toward Sustainable Health. *Crit Rev Plant Sci* 29(1):14-35.
3. Bourguignon J, Rebeille F, & Douce R (1999) Serine and glycine metabolism in higher plants. *Plant amino acids*, ed Singh BK (Marcel Dekker, Inc., New York), pp 111-146.
4. Storozhenko S, *et al.* (2007) Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol* 25(11):1277-1279.
5. Diaz De La Garza R, Gregory III J, & Hanson AD (2007) Folate biofortification of tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4218-4222.
6. Rébeillé F, Alban C, Bourguignon J, Ravanel S, & Douce R (2007) The role of plant mitochondria in the biosynthesis of coenzymes. *Photosynth Res* 92(2):149-162.
7. Bertino JR (2009) Cancer research: from folate antagonism to molecular targets. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 22(4):577-582.
8. Nzila A (2006) Inhibitors of de novo folate enzymes in *Plasmodium falciparum*. *Drug Discov Today* 11(19-20):939-944.
9. Wang P, Wang Q, Aspinall TV, Sims PFG, & Hyde JE (2004) Transfection studies to explore essential folate metabolism and antifolate drug synergy in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 51(5):1425-1438.

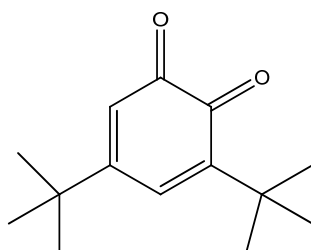
10. Wang P, *et al.* (2010) Characterisation of the bifunctional dihydrofolate synthase-folylpolyglutamate synthase from *Plasmodium falciparum*; a potential novel target for antimalarial antifolate inhibition. *Mol Biochem Parasitol* 172(1):41-51.
11. Nzila A, Ward SA, Marsh K, Sims PF, & Hyde JE (2005) Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part II): activities as yet untargeted or specific to *Plasmodium*. *Trends Parasitol* 21(7):334-339.
12. Rattanachuen W, Jonsson M, Swedberg G, & Sirawaraporn W (2009) Probing the roles of non-homologous insertions in the N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* hydroxymethylpterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase. *Mol Biochem Parasitol* 168(2):135-142.
13. Hyde JE (2005) Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop* 94(3):191-206.
14. Siehl D (1999) The biosynthesis of tryptophan, tyrosine and phenylalanine from chorismate. *Plant amino acids*, ed Singh BK (Marcel Dekker, Inc., New York), pp 171-204.
15. Roux B & Walsh CT (1992) p-aminobenzoate synthesis in *Escherichia coli*: kinetic and mechanistic characterization of the amidotransferase PabA. *Biochemistry* 31(30):6904-6910.
16. Basset GJ, *et al.* (2004) Folate synthesis in plants: The p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1496-1501.
17. Zalkin H (1993) The amidotransferases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 66:203-309.
18. Camara D, Richefeu-Contesto C, Gambonnet B, Dumas R, & Rébeillé F (2011) The synthesis of pABA: Coupling between the glutamine amidotransferase and aminodeoxychorismate synthase domains of the bifunctional aminodeoxychorismate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* 505(1):83-90.
19. Ziebart KT & Toney MD (2010) Nucleophile Specificity in Anthranilate Synthase, Aminodeoxychorismate Synthase, Isochorismate Synthase, and Salicylate Synthase. *Biochemistry* 49(13):2851-2859.
20. Kerbarh O, *et al.* (2005) Mechanistic and inhibition studies of chorismate-utilizing enzymes. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 4):763-766.
21. Bulloch EM, *et al.* (2004) Identification of 4-amino-4-deoxychorismate synthase as the molecular target for the antimicrobial action of (6s)-6-fluoroshikimate. *J Am Chem Soc* 126(32):9912-9913.
22. Kozlowski MC, Tom NJ, Seto CT, Seffler AM, & Bartlett PA (1995) Chorismate-utilizing enzymes isochorismate synthase, anthranilate synthase, and p-aminobenzoate synthase: mechanistic insight through inhibitor design. *J Am Chem Soc* 117(8):2128-2140.
23. Payne RJ, *et al.* (2009) Synthesis and evaluation of 2,5-dihydrochorismate analogues as inhibitors of the chorismate-utilising enzymes. *Org Biomol Chem* 7(11):2421-2429.
24. Payne RJ, Bulloch EMM, Kerbarh O, & Abell C (2010) Inhibition of chorismate-utilising enzymes by 2-amino-4-carboxypyridine and 4-carboxypyridone and 5-carboxypyridone analogues. *Org Biomol Chem* 8(15):3534-3542.
25. Ziebart KT, *et al.* (2010) Targeting multiple chorismate-utilizing enzymes with a single inhibitor: validation of a three-stage design. *J Med Chem* 53(9):3718-3729.
26. Dixon S, *et al.* (2006) Aminodeoxychorismate synthase inhibitors from one-bead one-compound combinatorial libraries: "Staged" inhibitor design. *J Med Chem* 49(25):7413-7426.

27. Riedlinger J, *et al.* (2004) Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine Verrucosisporea strain AB-18-032. (Translated from eng) *J Antibiot (Tokyo)* 57(4):271-279 (in eng).
28. Keller S, Schadt HS, Ortel I, & Sussmuth RD (2007) Action of atrop-abyssomicin C as an inhibitor of 4-amino-4-deoxychorismate synthase PabB. *Angewandte Chemie-International Edition* 46(43):8284-8286.
29. Sahr T, *et al.* (2006) Folate synthesis in plants: purification, kinetic properties, and inhibition of aminodeoxychorismate synthase. *Biochem J* 396(1):157-162.
30. Zhang JH, Chung TDY, & Oldenburg KR (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 4(2):67-73.
31. Poobrasert O, Chai H, Pezzuto JM, & Cordell GA (1996) Cytotoxic degradation product of physostigmine. *J Nat Prod* 59(11):1087-1089.
32. Yang ST, Wilken LO, & Clark CR (1987) Liquid-chromatographic determination of the pH-dependent degradation of eseroline - hydrolysis product of physostigmine. *J Pharm Biomed Anal* 5(4):383-393.
33. Robinson B (1965) Structure of rubreserine a decomposition product of physostigmine. *J Pharm Pharmacol* 17(2):89-91.
34. Segel IH (1975) *Enzyme kinetics* (John Wiley and sons, New-York).
35. Quinlivan EP, *et al.* (2003) The folate precursor p-aminobenzoate is reversibly converted to its glucose ester in the plant cytosol. *J Biol Chem* 278(23):20731-20737.
36. Eudes A, *et al.* (2008) Metabolism of the folate precursor p-aminobenzoate in plants - Glucose ester formation and vacuolar storage. *J Biol Chem* 283(22):15451-15459.
37. Orsomando G, *et al.* (2006) Evidence for folate-salvage reactions in plants. *Plant J* 46(3):426-435.
38. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.
39. Zhang XH, Brotherton JE, Widholm JM, & Portis AR (2001) Targeting a nuclear anthranilate synthase alpha-subunit gene to the tobacco plastid genome results in enhanced tryptophan biosynthesis. Return of a gene to its pre-endosymbiotic origin. *Plant Physiol* 127(1):131-141.
40. Nakamura J, Straub K, Wu J, & Lou L (1995) The glutamine hydrolysis function of human gmp synthetase - Identification of an essential active-site cysteine. *J Biol Chem* 270(40):23450-23455.
41. Sibley LD, Messina M, & Niesman IR (1994) Stable dna transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12):5508-5512.
42. Roberts CW, *et al.* (2002) The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *J Infect Dis* 185:S25-S36.
43. Bhat JY, Shastri BG, & Balaram H (2008) Kinetic and biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* GMP synthetase. *Biochem J* 409:263-273.
44. Schroder M, Giermann N, & Zrenner R (2005) Functional analysis of the pyrimidine de novo synthesis pathway in solanaceous species. *Plant Physiol* 138(4):1926-1938.
45. Fox BA & Bzik DJ (2002) De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature* 415(6874):926-929.
46. Ellis S, Kraymer O, & Plachte FL (1943) Studies on physostigmine and related substances. III. Breakdown products of physostigmine; their inhibitory effect on cholinesterase and their pharmacological action. *Pharmacol Exp Ther* 79:309-319.

47. Bittner S (2006) When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* 30(3):205-224.
48. Meneceur P, *et al.* (2008) In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother* 52(4):1269-1277.
49. Loizeau K, *et al.* (2008) A Genome-Wide and Metabolic Analysis Determined the Adaptive Response of *Arabidopsis* Cells to Folate Depletion Induced by Methotrexate. *Plant Physiol* 148(4):2083-2095.
50. Bisanz C, *et al.* (2006) *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J* 394(Pt 1):197-205.
51. Allen RJ & Kirk K (2010) *Plasmodium falciparum* culture: the benefits of shaking. *Mol Biochem Parasitol* 169(1):63-65.
52. Bennett TN, *et al.* (2004) Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5):1807-1810.
53. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, & Riscoe M (2004) Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5):1803-1806.
54. Zhang GF, *et al.* (2005) Free and total para-aminobenzoic acid analysis in plants with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(8):963-969.
55. De Brouwer V, Zhang GF, Storozhenko S, Van Der Straeten D, & Lambert WE (2007) pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. *Phytochem Anal* 18:496-508.
56. De Brouwer V, *et al.* (2010) Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the sensitive determination of folates in rice. *J Chromatogr B* 878(3-4):509-513.
57. Mouillon JM, *et al.* (1999) Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant J* 20(2):197-205.

III. Conclusion

Par une approche de criblage à haut débit, nous avons identifié dans une chimiothèque commerciale (Prestwick[®]) une molécule capable d'inhiber la biosynthèse du pABA en bloquant l'activité GAT de GAT-ADCS. Cette molécule impacte *in vivo* la croissance des plantes et des parasites du *phylum* des apicomplexes en diminuant la biosynthèse des folates, comme le montre la récupération partielle de croissance lorsque cette molécule est associée avec du pABA ou du 5-formyl-THF. Cette molécule a une structure du type hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole-5,6-dione, et représente donc une nouvelle famille de molécules anti-folates. Le mode d'action de l'inhibition n'est toutefois pas encore compris. Lorsque l'on compare la structure de l'eseroline (inactif) avec celle de la rubreserine (actif) la seule différence est le remplacement sur le noyau aromatique d'une fonction hydroxyle par deux fonctions carbonyles. Ces deux fonctions carbonyles semblent donc être à l'origine du mécanisme d'inhibition. Ce type de molécules, présentant une structure *o*-quinones, peuvent réagir de façon non enzymatique (addition de Michael) avec des groupes nucléophiles, comme ceux que l'on trouve chez certains résidus d'acides aminés (R-SH, R-NH₂) (Bittner 2006). Nous avons alors testé une autre molécule, la 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzoquinone (DtBQ) disponible parmi les produits commercialisés par Sigma-Aldrich (figure 39).



3,5-Di-*tert*-butyl-1,2-benzoquinone

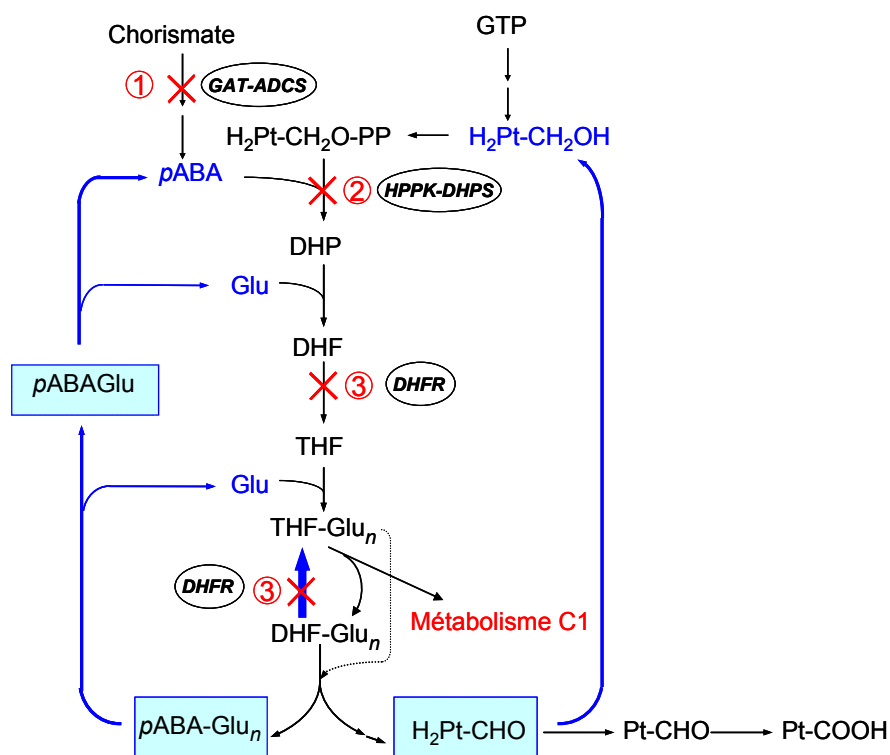
Figure 39 : Structure de la 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzoquinone (DtBQ)

Cette molécule inhibe aussi les activités GAT de la GAT-ADCS et de la GMP synthase, avec des IC₅₀ d'environ 2 μ M et 0.5 μ M (conditions de dosage identiques à celles utilisées avec la rubreserine), respectivement, mais n'a pas ou peu d'effets sur l'activité de l'antranilate synthase. Le DtBQ inhibe aussi la croissance des plantules d'*Arabidopsis*, mais, à la différence de ce que l'on observe avec la rubreserine, il n'est pas possible de restaurer, même partiellement, cette croissance par l'addition de pABA ou de 5-Formyl-THF, ni même par celle d'un cocktail contenant pABA, GMP et anthranilate. Il semblerait donc que cette

molécule soit moins spécifique de la voie de biosynthèse du pABA que la rubreserine. L'ensemble de ces observations suggère donc que les deux fonctions carbonyles sont à l'origine de l'inhibition, mais que les substituants du noyau aromatique sont importants pour la spécificité d'action de la molécule. Des expériences de cristallographie aurait sans doute permis de mieux comprendre le mode d'action de la rubreserine. Malheureusement nous n'avons pas réussi à obtenir de cristaux de GAT-ADCS, en présence ou non de rubreserine, malgré de nombreuses tentatives.

Nos résultats montrent aussi que la rubreserine diminue d'environ 40 % la teneur en folates des cellules d'*Arabidopsis*, quelle que soit la concentration de l'inhibiteur dans une fourchette 25-100 μ M. L'utilisation de sulfanilamide conduit à une diminution d'environ 60 % dans la même fourchette de concentration. Dans ces deux situations, la teneur en folates reste donc substantielle. Par contre, l'utilisation de methotrexate provoque un effondrement quasi-total de la concentration en folates (Loizeau et al. 2008). Une telle différence est peut-être liée au recyclage des cofacteurs et aux réactions impliquées dans ce recyclage. Dans le cas de la rubreserine, le recyclage des entités pABA et ptérine n'est pas bloqué car celui-ci a lieu au niveau de l'activité HPPK-DHPS, en aval donc du point d'inhibition (voir figure 40).

Par contre, l'inhibition de l'activité HPPK-DHPS par le sulfanilamide, devrait conduire au blocage du recyclage des folates et, donc, à la disparition complète de ces cofacteurs, tout comme cela est observé pour le methotrexate. Cela n'est pas le cas, ce qui laisse penser que le recyclage des parties pABA et ptérine n'est pas aussi vital pour le maintien du pool de folates que l'activité DHFR. Dans ces conditions, il est possible que le clivage du cofacteur en pABA et ptérine, à l'origine du recyclage, se produise au niveau du DHF (figure 40) et non pas du THF, comme il a été suggéré par l'équipe de Hanson (Hanson et Gregory 2002). En soutien à cette hypothèse, il convient de signaler que l'apparition et l'accumulation de DHF n'ont jamais pu être observées en présence de Methotrexate, ce qui semble bien indiquer que celui-ci est dégradé très rapidement.



PERSPECTIVES

I. La voie de biosynthèse du pABA

Nous n'avons pas réussi au cours de ce travail à obtenir la structure tridimensionnelle de la GAT-ADCS d'*Arabidopsis*. Ces données auraient pourtant été essentielles pour mieux comprendre comment les deux domaines de cette enzyme bifonctionnelle sont coordonnés, et comment le NH_3 libéré par la glutamine est canalisé vers le domaine ADCS. Il conviendrait donc de poursuivre les efforts dans cette direction afin de trouver les bonnes conditions de cristallisation. De même, il serait intéressant de produire, de manière stable et fonctionnelle, les GAT-ADCS des parasites *T. gondii* et *P. falciparum* afin de comparer leurs propriétés cinétiques avec celle des plantes. Cette comparaison permettrait peut-être de sélectionner des inhibiteurs spécifiques à ces organismes.

Jusqu'à présent, aucune ADCL d'organisme eucaryote n'a été caractérisée d'un point de vue biochimique. Seule l'enzyme de plante a été identifiée, mais nous n'avons pas réussi à produire une enzyme recombinante fonctionnelle, au contraire de l'ADCL d'*E. coli*. Compte tenu du peu d'homologie qui existe entre les ADCL des différents organismes, il nous paraît important de confirmer par des mesures d'activité que le gène identifié est bien celui de l'ADCL, et de préciser les caractéristiques biochimiques de cette dernière enzyme, caractéristiques encore peu étudiées même chez les organismes procaryotes. Cette approche est d'autant plus importante que l'ADCL est aussi une cible potentielle pour d'éventuels inhibiteurs à effets antibiotiques ou antiparasitaires.

Le pABA formé grâce aux réactions couplées de la GAT-ADCS et de l'ADCL est présent sous deux formes : une forme libre et une forme conjuguée avec une molécule de glucose. Cette dernière forme, essentiellement présente dans la vacuole, représente 80 % de la totalité du pABA. Le seul rôle métabolique connu du pABA est son implication dans la biosynthèse du folate. Dans ces conditions, comment l'équilibre des concentrations entre pABA et pABA-Glc est-il régi ? Pourquoi transformer la grande majorité du pABA produit dans le plaste en pABA-Glc stocké dans la vacuole ? Cette forme conjuguée a-t-elle un rôle physiologique non encore déterminé ou ne sert-elle que de réserve, comme il a été suggéré ? En effet, nos résultats suggèrent que le pABA-Glc n'est pas rapidement mobilisé lorsque la synthèse de pABA est inhibée, mais cela reste à être confirmé. L'estérification du pABA est catalysée par une UDP-glucose:pABA acyl-glucosyltransférase (Eudes et al. 2008), une enzyme qui devrait donc jouer un rôle clé dans le control de l'homéostasie du pABA. L'étude

de cette activité nous paraît essentielle pour bien comprendre le métabolisme du pABA dans son ensemble.

II. L'inhibition de la biosynthèse du pABA

L'inhibiteur que nous avons identifié n'est sans doute pas utilisable dès à présent comme médicament antiparasitaire. En effet, il convient maintenant de déterminer son efficacité et sa toxicité afin d'évaluer son index thérapeutique. Celui-ci se définit comme le rapport entre la dose thérapeutique efficace sur 50 % de la population (ED_{50}) et la dose létale pour 50 % de cette même population (LD_{50}). Pour avoir un bon index thérapeutique, il faut que la valeur ED_{50} soit inférieure de plusieurs ordres de grandeur à celle de LD_{50} . La détermination de ces paramètres doit se faire *in vivo*, c'est-à-dire sur animaux entiers, et non sur de simples cultures de cellules. Ensuite, il conviendra sans doute d'améliorer la molécule, c'est-à-dire d'identifier les substituants du squelette hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole-5,6-dione qui permettront de combiner la meilleure inhibition de croissance des parasites avec la moindre toxicité pour l'organisme parasité. Il s'agit là d'un travail de longue haleine, qui fait appel à des approches de chimie de synthèse et de pharmacologie, nécessitant d'autres collaborations avec d'autres équipes. La poursuite de ce projet dépendra donc pour beaucoup des financements qui pourront être obtenus à cette fin.

Les résultats obtenus dans ce travail valident l'utilisation de la voie de biosynthèse du pABA comme cible antiparasitaire. Pour le moment, nous avons ciblé exclusivement l'activité GAT de la GAT-ADCS. La synthèse de pABA nécessite aussi une activité ADCS et ADCL, qui représentent donc deux autres cibles potentielles pour des inhibiteurs de la biosynthèse du folate. De ce point de vue, il est intéressant de constater qu'une souche de bactérie K.O. pour l'activité ADCL ne peut se développer sans la présence de pABA dans le milieu de culture (Basset et al. 2004d). Au cours de nos recherches, nous avons mis au point une méthode qui permet de doser facilement le pABA produit par l'action combinée de la GAT-ADCS et de l'ADCL. Nous pouvons donc à présent utiliser ce système couplé pour un nouveau criblage à haut débit dans l'espoir de trouver parmi les chimiothèques existantes des molécules qui inhiberaient spécifiquement les activités ADCS et ADCL. Cette campagne d'investigation est en cours, la chimiothèque criblée étant celle de l'Institut Curie qui contient à l'heure actuelle environ 8000 molécules.

REFERENCES

- Appling, D. R. (1991). "Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes." Faseb J **5**(12): 2645-51.
- Archibald, J. M. and Keeling, P. J. (2002). "Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution." Trends Genet **18**(11): 577-84.
- Aslinia, F., Mazza, J. J., et al. (2006). "Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis." Clin Med Res **4**(3): 236-41.
- Basset, G. J., Quinlivan, E. P., et al. (2004a). "Folate synthesis in plants: The p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 1496-1501.
- Basset, G. J. C., Quinlivan, E. P., et al. (2004b). "Folate synthesis in plants: The p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(6): 1496-1501.
- Basset, G. J. C., Ravanel, S., et al. (2004c). "Folate synthesis in plants: the last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase." Plant J **40**(4): 453-61.
- Basset, G. J. C., Ravanel, S., et al. (2004d). "Folate synthesis in plants: the last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase." Plant Journal **40**(4): 453-461.
- Bastien, O., Lepinat, S., et al. (2004). "Analysis of the compositional biases in Plasmodium falciparum genome and proteome using Arabidopsis thaliana as a reference." Gene **336**(2): 163-73.
- Bauwe, H. and Kolukisaoglu, U. (2003). "Genetic manipulation of glycine decarboxylation." J Exp Bot **54**(387): 1523-35.
- Bedhomme, M., Hoffmann, M., et al. (2005). "Folate metabolism in plants - An Arabidopsis homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts." Journal of Biological Chemistry **280**(41): 34823-34831.
- Bennett, T. N., Paguio, M., et al. (2004). "Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(5): 1807-1810.
- Berger, J. R. (2003). "Mass lesions of the brain in AIDS: the dilemmas of distinguishing toxoplasmosis from primary CNS lymphoma." AJNR Am J Neuroradiol **24**(4): 554-5.
- Bernt, E. and Bergmeyer, H. U. (1974). L-glutamate. UV-assay with glutamate deshydrogenase and NAD. Methods of enzymatic analysis. H. U. Bergmeyer, Academic Press, Inc, New-York, San Francisco, London. **4**: 1704-1708.
- Bertino, J. R. (2009). "Cancer research: from folate antagonism to molecular targets." Best Practice & Research Clinical Haematology **22**(4): 577-582.
- Besson, V., Rebeille, F., et al. (1993). "Effects of Tetrahydrofolate Polyglutamates on the Kinetic-Parameters of Serine Hydroxymethyltransferase and Glycine Decarboxylase from Pea Leaf Mitochondria." Biochemical Journal **292**: 425-430.
- Bhat, J. Y., Shastri, B. G., et al. (2008). "Kinetic and biochemical characterization of Plasmodium falciparum GMP synthetase." Biochemical Journal **409**: 263-273.
- Bittner, S. (2006). "When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences." Amino Acids **30**(3): 205-224.
- Blancquaert, D., Storozhenko, S., et al. (2010). "Folates and Folic Acid: From Fundamental Research Toward Sustainable Health." Critical Reviews in Plant Sciences **29**(1): 14-35.

- Block, M. A., Tewari, A. K., et al. (2002). "The plant S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes." Eur J Biochem **269**(1): 240-8.
- Botte, C., Saidani, N., et al. (2008). "Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like eitope in *Toxoplasma gondii*." J Lipid Res.
- Bourguignon, J., Rebeille, F., et al. (1999a). Serine and glycine metabolism in higher plants. Plant amino acids. B. K. Singh. New York, Marcel Dekker, Inc.: 111-146.
- Bourguignon, J., Rebeille, F., et al. (1999b). Serine and glycine metabolism in higher plants. Plant amino acids. B. K. Singh. New York, Marcel Dekker, Inc.: 111-146.
- Bozzo, G. G., Basset, G. J. C., et al. (2008). "Characterization of the folate salvage enzyme p-aminobenzoylglutamate hydrolase in plants." Phytochemistry **69**(1): 29-37.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Bulloch, E. M., Jones, M. A., et al. (2004). "Identification of 4-amino-4-deoxychorismate synthase as the molecular target for the antimicrobial action of (6s)-6-fluoroshikimate." J Am Chem Soc **126**(32): 9912-3.
- Buryanov, Y. I. and Shevchuk, T. V. (2005). "DNA methyltransferases and structural-functional specificity of eukaryotic DNA modification." Biochemistry-Moscow **70**(7): 730-742.
- Camara, D., Richefeu-Contesto, C., et al. (2011). "The synthesis of pABA: Coupling between the glutamine amidotransferase and aminodeoxychorismate synthase domains of the bifunctional aminodeoxychorismate synthase from *Arabidopsis thaliana*." Arch. Biochem. Biophys. **505**: 83-90.
- Cavalier-Smith, T. (1998). "A revised six-kingdom system of life." Biol Rev Camb Philos Soc **73**(3): 203-66.
- Cavalier-Smith, T. (2003). "Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae)." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1429): 109-33; discussion 133-4.
- Cavalier-Smith, T. (2004). "Only six kingdoms of life." Proc Biol Sci **271**(1545): 1251-62.
- Cengel, A. and Sahinarslan, A. (2006). "Nitric oxide and cardiovascular system." Anadolu Kardiyol Derg **6**(4): 364-8.
- Cheng, Z., Sattler, S., et al. (2003). "Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes." Plant Cell **15**(10): 2343-56.
- Choi, S. W. and Mason, J. B. (2002). "Folate and carcinogenesis: An integrated scheme (Reprinted from vol 130, pg 129, 2000)." Journal of Nutrition **132**(12): 129-132.
- Clarke, T. F. t. and Clark, P. L. (2008). "Rare codons cluster." PLoS One **3**(10): e3412.
- Cossins, E. A. and Chen, L. (1997). "Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi." Phytochemistry **45**(3): 437-52.
- Cox, F. E. (2002). "History of human parasitology." Clin Microbiol Rev **15**(4): 595-612.
- Crawford, I. P. (1989). "Evolution of a biosynthetic pathway: the tryptophan paradigm." Annu Rev Microbiol **43**: 567-600.
- Czok, R. and Lamprecht, W. (1974). Pyruvate. Fluorimetric assay. Methods of Enzymatic analysis. H. U. Bergmeyer, Academic Press, Inc, New-York, San Francisco, London. **3**: 1446-1451.
- De Brouwer, V., Storozhenko, S., et al. (2010). "Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the sensitive determination of folates in rice." J. Chromatogr. B **878**(3-4): 509-513.

- De Brouwer, V., Zhang, G. F., et al. (2007). "pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates." Phytochem. Anal. **18**: 496-508.
- Diaz De La Garza, R., Gregory Iii, J., et al. (2007). "Folate biofortification of tomato fruit." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 4218-4222.
- Dixon, S., Ziebart, K. T., et al. (2006). "Aminodeoxychorismate synthase inhibitors from one-bead one-compound combinatorial libraries: "Staged" inhibitor design." Journal Of Medicinal Chemistry **49**(25): 7413-7426.
- Douce, R., Bourguignon, J., et al. (2001). "The glycine decarboxylase system: a fascinating complex." Trends in Plant Science **6**(4): 167-176.
- Douce, R. and Neuburger, M. (1999). "Biochemical dissection of photorespiration." Curr Op in Plant Biol **2**(3): 214-22.
- Eden, A., Gaudet, F., et al. (2003). "Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation." Science **300**(5618): 455.
- Efron, B. and Tibshirani, R. (1994). An Introduction to the Bootstrap, Chapman & Hall/CRC.
- Ellis, S., Krayner, O., et al. (1943). "Studies on physostigmine and related substances. III. Breakdown products of physostigmine; their inhibitory effect on cholinesterase and their pharmacological action." Pharmacol. Exp. Ther. **79**: 309-319.
- Eudes, A., Bozzo, G. G., et al. (2008). "Metabolism of the folate precursor p-aminobenzoate in plants - Glucose ester formation and vacuolar storage." Journal of Biological Chemistry **283**(22): 15451-15459.
- Fan, Y. B., Lund, L., et al. (2009). "A Combined Theoretical and Experimental Study of the Ammonia Tunnel in Carbamoyl Phosphate Synthetase." Journal of the American Chemical Society **131**(29): 10211-10219.
- Fichera, M. E. and Roos, D. S. (1997). "A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites." Nature **390**(6658): 407-9.
- Fox, B. A. and Bzik, D. J. (2002). "De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*." Nature **415**(6874): 926-929.
- Goubet, F., Council, L. N., et al. (1998). "Identification and partial characterisation of the pectin methyltransferase "homogalacturonan-methyltransferase" from membranes of tobacco cell suspensions." Plant Physiol. **116**: 337-347.
- Goyer, A., Collakova, E., et al. (2005). "5-Formyltetrahydrofolate is an inhibitory but well tolerated metabolite in *Arabidopsis* leaves." Journal of Biological Chemistry **280**(28): 26137-26142.
- Goyer, A., Illarionova, V., et al. (2004). "Folate biosynthesis in higher plants. cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of dihydroneopterin aldolases." Plant Physiol **135**(1): 103-11.
- Green, J. M. and Nichols, B. P. (1991). "p-Aminobenzoate biosynthesis in *Escherichia coli*. Purification of aminodeoxychorismate lyase and cloning of *pabC*." J Biol Chem **266**(20): 12971-5.
- Gregory, J. F., 3rd and Quinlivan, E. P. (2002). "In vivo kinetics of folate metabolism." Annu Rev Nutr **22**: 199-220.
- Grillo, M. A. and Colombatto, S. (2005). "S-Adenosylmethionine and protein methylation." Amino Acids **28**(4): 357-362.
- Hanson, A. D., Gage, D. A., et al. (2000). "Plant one-carbon metabolism and its engineering." Trends Plant Sci **5**(5): 206-13.
- Hanson, A. D. and Gregory, J. F., 3rd (2002). "Synthesis and turnover of folates in plants." Curr Opin Plant Biol **5**(3): 244-9.
- Hanson, A. D., Huang, Z. H., et al. (1993). "Evidence that the putative compatible solute 5-dimethylsulfoniopentanoate is an extraction artifact." Plant Physiol **101**(4): 1391-3.

- He, C. Y., Shaw, M. K., et al. (2001). "A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." Embo Journal **20**(3): 330-339.
- Hemsworth, B. A. and West, G. B. (1970). "Anticholinesterase activity of some degradation products of physostigmine." J Pharm Sci **59**(1): 118-20.
- Huang, M. and Gibson, F. (1970). "Biosynthesis of 4-aminobenzoate in *Escherichia coli*." J Bacteriol **102**(3): 767-73.
- Hubner, R. A. and Houlston, R. S. (2009). "Folate and colorectal cancer prevention." Br J Cancer **100**(2): 233-9.
- Hyde, J. E. (2005). "Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*." Acta Trop **94**(3): 191-206.
- Ishikawa, T., Machida, C., et al. (2003). "The GLOBULAR ARREST1 gene, which is involved in the biosynthesis of folates, is essential for embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*." Plant Journal **33**(2): 235-244.
- James, F., Paquet, L., et al. (1995). "Evidence implicating dimethylsulfonylpropionaldehyde as an intermediate in dimethylsulfonylpropionate biosynthesis." Plant Physiol **108**(4): 1439-48.
- Joy, D. A., Feng, X., et al. (2003). "Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*." Science **300**(5617): 318-21.
- Keller, S., Schadt, H. S., et al. (2007). "Action of atrop-abyssomicin C as an inhibitor of 4-amino-4-deoxychorismate synthase PabB." Angewandte Chemie-International Edition **46**(43): 8284-8286.
- Kerbarh, O., Bulloch, E. M., et al. (2005). "Mechanistic and inhibition studies of chorismate-utilizing enzymes." Biochem Soc Trans **33**(Pt 4): 763-6.
- Kikuchi, G., Motokawa, Y., et al. (2008). "Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia." Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences **84**(7): 246-263.
- Klaus, S. M., Wegkamp, A., et al. (2005). "A nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate in the folate synthesis pathway of bacteria and plants." J Biol Chem **280**(7): 5274-80.
- Kohler, S., Delwiche, C. F., et al. (1997). "A plastid of probable green algal origin in *Apicomplexan* parasites." Science **275**(5305): 1485-9.
- Kozlowski, M. C., Tom, N. J., et al. (1995). "Chorismate-utilizing enzymes isochorismate synthase, anthranilate synthase, and p-aminobenzoate synthase: mechanistic insight through inhibitor design." J. Am. Chem. Soc. **117**(8): 2128-2140.
- Leys, D., Basran, J., et al. (2003). "Channelling and formation of 'active' formaldehyde in dimethylglycine oxidase." Embo Journal **22**(16): 4038-4048.
- Li, S., Arning, E., et al. (2009). "Regulation of homocysteine homeostasis through the transcriptional coactivator PGC-1 α ." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(3): E543-8.
- Liang, P. H. and Anderson, K. S. (1998). "Substrate channeling and domain-domain interactions in bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase." Biochemistry **37**(35): 12195-205.
- Loizeau, K., De Brouwer, V., et al. (2008). "A Genome-Wide and Metabolic Analysis Determined the Adaptive Response of *Arabidopsis* Cells to Folate Depletion Induced by Methotrexate." Plant Physiology **148**(4): 2083-2095.
- Loizeau, K., Gambonnet, B., et al. (2007). "Regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis*: The N-terminal regulatory domain of cystathionine gamma-synthase is cleaved in response to folate starvation." Plant Physiology **145**(2): 491-503.
- Malhotra, K., Kim, S. T., et al. (1995). "Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA

- photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity." Biochemistry **34**(20): 6892-9.
- Marechal, E., Awai, K., et al. (2000). "The multigenic family of monogalactosyl diacylglycerol synthases." Biochem Soc Trans **28**(6): 732-8.
- Mattson, M. P. (2003). "Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders." Ann Intern Med **139**(5 Pt 2): 441-4.
- McFadden, G. I., Reith, M. E., et al. (1996). "Plastid in human parasites." Nature **381**(6582): 482.
- McGuire, J. J. and Bertino, J. R. (1981a). "Enzymatic-Synthesis and Function of Folylpolyglutamates." Molecular and Cellular Biochemistry **38**(AUG): 19-48.
- McGuire, J. J. and Bertino, J. R. (1981b). "Enzymatic synthesis and function of polyglutamate." Mol Cell Biochem **38**: 19-48.
- McGuire, J. J., Haile, W. H., et al. (2003). "Potent inhibition of human folylpolyglutamate synthetase by a phosphinic acid mimic of the tetrahedral reaction intermediate." Biochemical Pharmacology **65**(3): 315-318.
- McKinnon, P. J. and Caldecott, K. W. (2007). "DNA strand break repair and human genetic disease." Annu Rev Genomics Hum Genet **8**: 37-55.
- Meneceur, P., Bouldouyre, M. A., et al. (2008). "In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone." Antimicrob. Agents Chemother. **52**(4): 1269-1277.
- Montoya, J. G. and Liesenfeld, O. (2004). "Toxoplasmosis." Lancet **363**(9425): 1965-76.
- Morollo, A. A. and Eck, M. J. (2001). "Structure of the cooperative allosteric anthranilate synthase from *Salmonella typhimurium*." Nat Struct Biol **8**(3): 243-7.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays." Journal of Immunological Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mouillon, J. M., Aubert, S., et al. (1999). "Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism." Plant Journal **20**(2): 197-205.
- Mouillon, J. M., Ravanel, S., et al. (2002). "Folate synthesis in higher-plant mitochondria: coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropteroate synthase activities." Biochemical Journal **363**: 313-319.
- Nakai, T., Mizutani, H., et al. (2000). "Three-dimensional structure of 4-amino-4-deoxychorismate lyase from *Escherichia coli*." J Biochem **128**(1): 29-38.
- Nakamura, J., Straub, K., et al. (1995). "The glutamine hydrolysis function of human gmp synthetase - Identification of an essential active-site cysteine." Journal of Biological Chemistry **270**(40): 23450-23455.
- Neuburger, M., Rebeille, F., et al. (1996). "Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants." Journal of Biological Chemistry **271**(16): 9466-9472.
- Nichols, B. P., Seibold, A. M., et al. (1989). "para-aminobenzoate synthesis from chorismate occurs in two steps." J Biol Chem **264**(15): 8597-601.
- Noiriel, A., Naponelli, V., et al. (2007). "Folate salvage in plants: pterin aldehyde reduction is mediated by multiple non-specific aldehyde reductases." Plant Journal **51**(3): 378-389.
- Norton, B. and Pearson, E. S. (1976). "A note on the background to, and refereeing of, R. A. Fisher's 1918 paper 'On the correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance'." Notes Rec R Soc Lond **31**(1): 151-62.
- Nour, J. M. and Rabinowitz, J. C. (1991). "Isolation, characterization, and structural organization of 10-formyltetrahydrofolate synthetase from spinach leaves." J Biol Chem **266**(27): 18363-9.

- Nour, J. M. and Rabinowitz, J. C. (1992). "Isolation and sequencing of the cDNA coding for spinach 10-formyltetrahydrofolate synthetase. Comparisons with the yeast, mammalian, and bacterial proteins." J Biol Chem **267**(23): 16292-6.
- Nzila, A. (2006a). "Inhibitors of de novo folate enzymes in *Plasmodium falciparum*." Drug Discovery Today **11**(19-20): 939-944.
- Nzila, A. (2006b). "The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **57**(6): 1043-1054.
- Nzila, A., Ward, S. A., et al. (2005). "Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part II): activities as yet untargeted or specific to *Plasmodium*." Trends Parasitol **21**(7): 334-9.
- Orsomando, G., Bozzo, G. G., et al. (2006a). "Evidence for folate-salvage reactions in plants." Plant J **46**(3): 426-35.
- Orsomando, G., Bozzo, G. G., et al. (2006b). "Evidence for folate-salvage reactions in plants." Plant Journal **46**(3): 426-435.
- Orsomando, G., de la Garza, R. D., et al. (2005). "Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles." J Biol Chem **280**(32): 28877-84.
- Paik, W. K., Paik, D. C., et al. (2007). "Historical review: the field of protein methylation." Trends in Biochemical Sciences **32**(3): 146-152.
- Parsons, J. F., Jensen, P. Y., et al. (2002). "Structure of *Escherichia coli* aminodeoxychorismate synthase: architectural conservation and diversity in chorismate-utilizing enzymes." Biochemistry **41**(7): 2198-208.
- Payne, R. J., Bulloch, E. M. M., et al. (2010). "Inhibition of chorismate-utilising enzymes by 2-amino-4-carboxypyridine and 4-carboxypyridone and 5-carboxypyridone analogues." Org Biomol Chem **8**(15): 3534-42.
- Payne, R. J., Bulloch, E. M. M., et al. (2009). "Synthesis and evaluation of 2,5-dihydrochorismate analogues as inhibitors of the chorismate-utilising enzymes." Org Biomol Chem **7**(11): 2421-9.
- Pokorny, R., Klar, T., et al. (2005). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*." Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications **61**: 935-938.
- Poobrasert, O., Chai, H., et al. (1996). "Cytotoxic degradation product of physostigmine." Journal of Natural Products **59**(11): 1087-1089.
- Prabhu, V., Chatson, K. B., et al. (1996). "¹³C nuclear magnetic resonance detection of interactions of serine hydroxymethyltransferase with C1-tetrahydrofolate synthase and glycine decarboxylase complex activities in *Arabidopsis*." Plant Physiol **112**(1): 207-16.
- Prabhu, V., Chatson, K. B., et al. (1998). "Effects of sulfanilamide and methotrexate on ¹³C fluxes through the glycine decarboxylase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system in *Arabidopsis*." Plant Physiol **116**(1): 137-44.
- Quinlivan, E. P., Roje, S., et al. (2003). "The folate precursor p-aminobenzoate is reversibly converted to its glucose ester in the plant cytosol." J Biol Chem **278**(23): 20731-7.
- Rattanachuen, W., Jonsson, M., et al. (2009). "Probing the roles of non-homologous insertions in the N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* hydroxymethylpterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase." Molecular and Biochemical Parasitology **168**(2): 135-142.
- Ravanel, S., Block, M. A., et al. (2004). "Methionine metabolism in plants - Chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol." Journal of Biological Chemistry **279**(21): 22548-22557.

- Ravanel, S., Cherest, H., et al. (2001). "Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: Molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(26): 15360-15365.
- Rayl, E. A., Green, J. M., et al. (1996). "Escherichia coli aminodeoxychorismate synthase: analysis of pabB mutations affecting catalysis and subunit association." Biochim Biophys Acta **1295**(1): 81-8.
- Rébeillé, F., Alban, C., et al. (2007). "The role of plant mitochondria in the biosynthesis of coenzymes." Photosynth. Res. **92**(2): 149-162.
- Rebeille, F., Macherel, D., et al. (1997). "Folate biosynthesis in higher plants: Purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria." Embo Journal **16**(5): 947-957.
- Rebeille, F., Neuburger, M., et al. (1994). "Interaction between Glycine Decarboxylase, Serine Hydroxymethyltransferase and Tetrahydrofolate Polyglutamates in Pea Leaf Mitochondria." Biochemical Journal **302**: 223-228.
- Rébeillé, F., Ravanel, S., et al. (2006). "Folates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement." Physiol. Plant. **126**(3): 330-342.
- Riedlinger, J., Reicke, A., et al. (2004). "Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine Verrucospora strain AB-18-032." J Antibiot (Tokyo) **57**(4): 271-9.
- Roberts, C. W., Roberts, F., et al. (2002). "The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites." Journal of Infectious Diseases **185**: S25-S36.
- Robinson, B. (1965). "Structure of rubreserine a decomposition product of physostigmine." J. Pharm. Pharmacol. **17**(2): 89-91.
- Roje, S., Wang, H., et al. (1999). "Isolation, characterization, and functional expression of cDNAs encoding NADH-dependent methylenetetrahydrofolate reductase from higher plants." J Biol Chem **274**(51): 36089-96.
- Roux, B. and Walsh, C. T. (1992). "p-aminobenzoate synthesis in *Escherichia coli*: kinetic and mechanistic characterization of the amidotransferase PabA." Biochemistry **31**(30): 6904-10.
- Rubnov, S., Levy, D., et al. (1999). "Liquid chromatographic analysis of physostigmine salicylate and its degradation products." J Pharm Biomed Anal **18**(6): 939-45.
- Rudolph, J. and Stubbe, J. (1995). "Investigation of the mechanism of phosphoribosylamine transfer from glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase to glycylamide ribonucleotide synthetase." Biochemistry **34**(7): 2241-50.
- Sahr, T., Ravanel, S., et al. (2006a). "Folate synthesis in plants: purification, kinetic properties, and inhibition of aminodeoxychorismate synthase." Biochem J **396**(1): 157-62.
- Sahr, T., Ravanel, S., et al. (2006b). "Folate synthesis in plants: purification, kinetic properties, and inhibition of aminodeoxychorismate synthase." Biochemical Journal **396**: 157-162.
- Sahr, T., Ravanel, S., et al. (2005). "Tetrahydrofolate biosynthesis and distribution in higher plants." Biochemical Society Transactions **33**: 758-762.
- Saze, H., Sasaki, T., et al. (2008). "Negative regulation of DNA methylation in plants." Epigenetics **3**(3): 122-124.
- Schadt, H. S., Schadt, S., et al. (2009). "2-Amino-2-deoxyisochorismate Is a Key Intermediate in *Bacillus subtilis* p-Aminobenzoic Acid Biosynthesis." Journal Of The American Chemical Society **131**(10): 3481-+.

- Schroder, M., Giermann, N., et al. (2005). "Functional analysis of the pyrimidine de novo synthesis pathway in solanaceous species." Plant Physiology **138**(4): 1926-1938.
- Scott, J., Rébeillé, F., et al. (2000). "Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods." J Sci Food Agric **80**: 795-824.
- Segel, I. H. (1975). Enzyme kinetics, John Wiley and sons, New-York.
- Shannon, K. W. and Rabinowitz, J. C. (1986). "Purification and characterization of a mitochondrial isozyme of C1-tetrahydrofolate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **261**(26): 12266-71.
- Sibley, L. D., Messina, M., et al. (1994). "STABLE DNA TRANSFORMATION IN THE OBLIGATE INTRACELLULAR PARASITE TOXOPLASMA-GONDII BY COMPLEMENTATION OF TRYPTOPHAN AUXOTROPHY." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(12): 5508-5512.
- Siddall, M. E. (1992). "Hohlzylinders." Parasitol Today **8**(3): 90-1.
- Siehl, D. (1999). The biosynthesis of tryptophan, tyrosine and phenylalanine from chorismate. Plant amino acids. B. K. Singh. New York, Marcel Dekker, Inc.: 171-204.
- Simpson, A. G. and Roger, A. J. (2004). "The real 'kingdoms' of eukaryotes." Curr Biol **14**(17): R693-6.
- Smilkstein, M., Sriwilaijaroen, N., et al. (2004). "Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(5): 1803-1806.
- Somani, S. M., Kutty, R. K., et al. (1990). "Eseroline, a metabolite of physostigmine, induces neuronal cell-death." Toxicology and Applied Pharmacology **106**(1): 28-37.
- Song, J. M. and Rabinowitz, J. C. (1993). "Function of yeast cytoplasmic C1-tetrahydrofolate synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2636-40.
- Spraggon, G., Kim, C., et al. (2001). "The structures of anthranilate synthase of *Serratia marcescens* crystallized in the presence of (i) its substrates, chorismate and glutamine, and a product, glutamate, and (ii) its end-product inhibitor, L-tryptophan." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6021-6.
- Storozhenko, S., De Brouwer, V., et al. (2007a). "Folate fortification of rice by metabolic engineering." Nat Biotechnol **25**(11): 1277-9.
- Storozhenko, S., Navarrete, O., et al. (2007b). "Cytosolic hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase/dihydropteroate synthase from *Arabidopsis thaliana* - A specific role in early development and stress response." Journal of Biological Chemistry **282**(14): 10749-10761.
- Straus, O. H. and Goldstein, A. (1943). "Zone Behavior of Enzymes : Illustrated by the Effect of Dissociation Constant and Dilution on the System Cholinesterase-Physostigmine." J Gen Physiol **26**(6): 559-85.
- Strong, W. B., Tendler, S. J., et al. (1990). "Purification and Properties of Serine Hydroxymethyltransferase and C1-Tetrahydrofolate Synthase from L1210 Cells." Journal of Biological Chemistry **265**(21): 12149-12155.
- Suh, J. R., Herbig, A. K., et al. (2001). "New perspectives on folate catabolism." Annu Rev Nutr **21**: 255-82.
- Sulewska, A., Niklinska, W., et al. (2007). "DNA methylation in states of cell physiology and pathology." Folia Histochemica Et Cytobiologica **45**(3): 149-158.
- Talarico, T. L., Dev, I. K., et al. (1991). "Purification and partial characterization of 7,8-dihydro-6-hydroxymethylpterin-pyrophosphokinase and 7,8-dihydropteroate synthase from *Escherichia coli* MC4100." J Bacteriol **173**(21): 7029-32.
- Tchantchou, F. and Shea, T. B. (2008). "Folate deprivation, the methionine cycle, and Alzheimer's disease." Vitam Horm **79**: 83-97.

- Torda, A. (2001). "Toxoplasmosis. Are cats really the source?" Aust Fam Physician **30**(8): 743-7.
- Trabetti, E. (2008). "Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardiovascular risk." J Appl Genet **49**(3): 267-82.
- Ushiroyama, T., Fukushima, T., et al. (1992). "Substrate channeling of NADH in mitochondrial redox processes." Curr Top Cell Regul **33**: 291-307.
- Van Wilder, V., De Brouwer, V., et al. (2009). "C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status." New Phytologist **182**(1): 137-145.
- Vance, D. E. and Walkey, C. J. (1998). "Roles for the methylation of phosphatidylethanolamine." Current Opinion in Lipidology **9**(2): 125-130.
- Viswanathan, V. K., Green, J. M., et al. (1995). "Kinetic characterization of 4-amino 4-deoxychorismate synthase from Escherichia coli." J Bacteriol **177**(20): 5918-23.
- Volpato, J. P. and Pelletier, J. N. (2009). "Mutational 'hot-spots' in mammalian, bacterial and protozoal dihydrofolate reductases associated with antifolate resistance: sequence and structural comparison." Drug Resist Updat **12**(1-2): 28-41.
- Waller, Z. A., Sewitz, S. A., et al. (2009). "A small molecule that disrupts G-quadruplex DNA structure and enhances gene expression." J Am Chem Soc **131**(35): 12628-33.
- Walter, R. F. and McFadden, G. I. (2005). "The apicoplast: A review of the derived plastid of apicomplexan parasites." Current Issues in Molecular Biology **7**: 57-79.
- Wang, P., Wang, Q., et al. (2004). "Transfection studies to explore essential folate metabolism and antifolate drug synergy in the human malaria parasite Plasmodium falciparum." Molecular Microbiology **51**(5): 1425-1438.
- Wang, P., Wang, Q., et al. (2010). "Characterisation of the bifunctional dihydrofolate synthase-folylpolyglutamate synthase from Plasmodium falciparum; a potential novel target for antimalarial antifolate inhibition." Molecular and Biochemical Parasitology **172**(1): 41-51.
- Werner-Felmayer, G., Golderer, G., et al. (2002). "Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects." Current Drug Metabolism **3**(2): 159-173.
- Yang, S. T., Wilken, L. O., et al. (1987). "Liquid-chromatographic determination of the pH-dependent degradation of eseroline - hydrolysis product of physostigmine." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **5**(4): 383-393.
- Ye, Q. Z., Liu, J., et al. (1990). "p-Aminobenzoate synthesis in Escherichia coli: purification and characterization of PabB as aminodeoxychorismate synthase and enzyme X as aminodeoxychorismate lyase." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(23): 9391-5.
- Yip, K. W., Ito, E., et al. (2006). "Potential use of alexidine dihydrochloride as an apoptosis-promoting anticancer agent." Mol Cancer Ther **5**(9): 2234-40.
- Zalkin, H. (1993). "The amidotransferases." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **66**: 203-309.
- Zhang, G. F., Mortier, K. A., et al. (2005a). "Free and total para-aminobenzoic acid analysis in plants with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **19**(8): 963-969.
- Zhang, G. F., Storozhenko, S., et al. (2005b). "Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1078**(1-2): 59-66.
- Zhang, J. H., Chung, T. D. Y., et al. (1999). "A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays." Journal of Biomolecular Screening **4**(2): 67-73.
- Zhang, X. H., Brotherton, J. E., et al. (2001). "Targeting a nuclear anthranilate synthase alpha-subunit gene to the tobacco plastid genome results in enhanced tryptophan

- biosynthesis. Return of a gene to its pre-endosymbiotic origin." Plant Physiology **127**(1): 131-141.
- Zhang, Y. and Meshnick, S. R. (1991). "Inhibition of Plasmodium falciparum dihydropteroate synthetase and growth in vitro by sulfa drugs." Antimicrob Agents Chemother **35**(2): 267-71.
- Zhong, R., Morrison, W. H., et al. (1998). "Dual methylation pathways in lignins biosynthesis." The plant cell **10**: 2023-2045.
- Ziebart, K. T., Dixon, S. M., et al. "Targeting multiple chorismate-utilizing enzymes with a single inhibitor: validation of a three-stage design." J Med Chem **53**(9): 3718-29.
- Ziebart, K. T., Dixon, S. M., et al. (2010). "Targeting multiple chorismate-utilizing enzymes with a single inhibitor: validation of a three-stage design." J Med Chem **53**(9): 3718-29.
- Ziebart, K. T. and Toney, M. D. (2010). "Nucleophile Specificity in Anthranilate Synthase, Aminodeoxychorismate Synthase, Isochorismate Synthase, and Salicylate Synthase." Biochemistry **49**(13): 2851-2859.
- Zrenner, R., Stitt, M., et al. (2006). "Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants." Annual Review of Plant Biology **57**: 805-836.

ANNEXE



**Empfangsbescheinigung
Receipt for documents
Récépissé de documents**

Liste der diesem Antrag beigefügten Unterlagen – Hiermit wird der Empfang der unten bezeichneten Dokumente bescheinigt. Wird im Falle der Einreichung der europäischen Patentanmeldung bei einer nationalen Behörde diese Empfangsbescheinigung vom Europäischen Patentamt übersandt, so ist sie als Mitteilung gemäß Regel 35(4) anzusehen (siehe Feld RENA).

Checklist of enclosed documents – Receipt of the documents indicated below is hereby acknowledged. If this receipt is issued by the European Patent Office and the European patent application was filed with a national authority, it serves as a communication under Rule 35(4) (see Section RENA).

Liste des documents annexés à la présente requête – Nous attestons le dépôt des documents désignés ci-dessous. Si, en cas de dépôt de la demande de brevet européen auprès d'un service national, l'Office européen des brevets délivre le présent récépissé de documents, ce récépissé est réputé être la notification visée à la règle 35(4) (cf. rubrique RENA).

CT ORES MENA Sandra 36 rue de St Pétersbourg 75008 Paris		 - 4 MAI 2011 Antastempel / Official stamp / Cachet officiel	
Tag des Eingangs (Regel 35 (2)) / Date of receipt (Rule 35(2)) Date de réception (règle 35(2))		DREC	
Anmeldenummer für den Schriftverkehr mit dem EPA; Aktenzeichen für Prioritäts- erklärungen / Application No. to be used in correspondence with the EPO; file No. to be used for priority declarations / N° de la demande à utiliser dans la cor- respondance avec l'OEB; n° de dépôt à utiliser pour la déclaration de priorité		- 4 MAI 2011 11290215.0	
Tag des Eingangs beim EPA (Regel 35 (4)) / Date of receipt at EPO (Rule 35(4)) / Date de réception à l'OEB (règle 35(4))		RENA	

- 47 A. Anmeldungsunterlagen und Prioritätsbeleg(e) / Application and priority documents / Pièces de la demande et document(s) de priorité
- Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) / Description (excluding sequence listing part) / Description (sauf partie réservée au listage des séquences)
 - Patentansprüche / Claims / Revendications
 - Zeichnung(en) / Drawing(s) / Dessin(s)
 - Sequenzprotokollteil der Beschreibung / Sequence listing part of description / Partie de la description réservée au listage des séquences
 - Zusammenfassung / Abstract / Abrégé
 - Früher eingereichte Anmeldung / Previously filed application / Demande déposée antérieurement
 - Übersetzung der Anmeldungsunterlagen / Translation of the application documents / Traduction des pièces de la demande
 - Übersetzung der früher eingereichten Anmeldung / Translation of the previously filed application / Traduction de la demande déposée antérieurement
 - Prioritätsbeleg(e) / Priority document(s) / Document(s) de priorité
 - Übersetzung des (der) Prioritätsbelegs/belegs / Translation of priority document(s) / Traduction du (des) document(s) de priorité
- 48 B. Der Anmeldung in der eingereichten Fassung liegen folgende Unterlagen bei: / This application as filed is accompanied by the items below: / Les pièces ci-après sont annexées à la présente demande:
- Vollmacht / Authorisation / Pouvoir
 - Allgemeine Vollmacht / General authorisation / Pouvoir général
 - Erfindernennung / Designation of inventor / Désignation de l'inventeur
 - Resultate der Recherche nach Regel 141 (1) / Search results under Rule 141(1) / Résultats de la recherche conformément à la règle 141(1)
 - Gebührenzahlungsvordruck (EPA Form 1010) / Voucher for the settlement of fees (EPO Form 1010) / Bordereau de règlement de taxes (OEB Form 1010)
 - Elektronischer Datenträger für Sequenzprotokoll / Electronic data carrier for sequence listing / Support électronique de données pour listage des séquences
 - Zusatzblatt / Additional sheet / Feuille supplémentaire
 - Sonstige Unterlagen (bitte hier spezifizieren) / Other documents (please specify here) / Autres documents (veuillez préciser)

Blattzahl* / Number of sheets* / Nombre de feuilles*	<input checked="" type="checkbox"/> 18	Gesamtzahl der Abbildungen* / Total number of figures* / Nombre total de figures*	<input checked="" type="checkbox"/> 4
	<input checked="" type="checkbox"/> 2		
	<input checked="" type="checkbox"/> 4		
	<input type="checkbox"/>		
	<input checked="" type="checkbox"/> 1		
	<input type="checkbox"/>		
	<input type="checkbox"/>		
Anzahl / Number / Nombre*	<input type="checkbox"/>		
	<input type="checkbox"/>		
	<input type="checkbox"/>		
AREF			
Zeichen des Anmelders / Applicant's reference / Référence du demandeur			
SM/IF-F263/438EP			
<input type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/>			
<input checked="" type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/>			
<input checked="" type="checkbox"/> Additional applicant(s) on additional sheet			
<input checked="" type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/> Einreichung direkt beim EPA / Direct filing with the EPO / Dépôt direct auprès de l'OEB			
<input checked="" type="checkbox"/> Einreichung bei einer nationalen Behörde / Filing with a national authority / Dépôt auprès d'un service national			

In the name of:

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

Inventors:

Djeneb CAMARA

Cordelia BISANZ

Caroline BARETTE

Lyn-Marie BIRKOLTZ

Marie-France CESBRON

Fabrice REBEILLE

For:

**COMPOUNDS WITH ANTIPARASITIC ACTIVITY AND APPLICATIONS
THEREOF**

The invention relates to novel compounds for use as medicaments, and in particular as medicaments for the prevention and/or the treatment of parasitic diseases caused by apicomplexans parasites. The invention also relates to pharmaceutical compositions containing such compounds of formula (I) as active principles. Finally, the present invention relates to the use of compounds of formula (I) as herbicides and/or algaecides and to herbicide and/or algaecide compositions containing such compounds.

The *Apicomplexa* phylum constitutes a particularly diverse group of unicellular protists. Besides, members of the Colpodellida sub-group, all apicomplexans are obligate intracellular parasites, infecting virtually all animals from mollusks to mammals. They were originally classified as protozoa (> 4000 species). Amongst them, the malaria parasite *Plasmodium sporozoa*, represents one of the most important threats for humankind, with 300 to 500 million estimated clinical cases and 1.5 to 3 million deaths each year, most of them African children. More benign, but widely spread is *Toxoplasma gondii*, a parasite causing congenital neurological birth defects and, along with *Cryptosporidium*, being the most reported opportunistic infection associated with immunosuppressive conditions, including AIDS. Other parasites in this phylum are of veterinary importance including pathogens of cattle and chicken, *Theileria* and *Eimeria*.

The *Apicomplexa* phylum contains several thousands of unicellular parasites among which:

- *Plasmodium falciparum*, the major malaria causative agent, as well as other parasites of the same genus (the three other *Plasmodium* species that cause human malaria: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*; the *Plasmodium* species known to infect other vertebrates: *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium reichenowi*, etc.);
- *Babesia microti*, the causative agent of human babesiosis, as well as all other parasites that cause babesiosis in mammals (*i.e.* *Babesia divergens*, *Babesia bigemina*, *Babesia major*, *Babesia bovis* (bovine babesiosis), *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* (canine babesiosis), *Babesia equi*, *Babesia caballi* (equine babesiosis), etc.);
- *Toxoplasma gondii*, the causative agent of toxoplasmosis in humans and other mammals;
- *Neospora caninum*, the causative agent of neosporosis;
- *Cryptosporidium hominis*, the causative agent of human cryptosporidiosis, as well as other parasites of the same genus (*Cryptosporidium parvum*,

etc.);

- *Theileria annulata*, the causative agent of theileriosis, as well as other parasites of the same genus (*Theileria parva*, etc.)

- *Sarcocystis neurona*, *Eimeria tenella*, *Gregarina niphandrodes*, as well as any other parasites of the *Apicomplexa* phylum causing infectious diseases in metazoans.

All apicomplexans share a polarized cellular organization schema, with a basal pole and an apical pole. Membrane compartmentalization exhibits some specific features as compared to other eukaryotic cells such as those of yeasts or mammals. The cell is polarized and exhibits a set of subcellular structures called the apical complex that contains a hollow truncated cone, the conoid, and three types of vesicular secretory organelles, namely rhoptries, micronemes and dense granules. During host cell invasion, the apical pole is the first to enter the cell. Membrane compartments include those known to be connected through the endomembrane flow in all eukaryotic cells, *i.e.* the Golgi, endoplasmic reticulum, nuclear envelope and plasma membrane. A peripheral inner membrane complex is applied to the plasma membrane surface. Semi-autonomous organelles include a mitochondria surrounded by two membranes, and the apicoplast (absent in some genera such as *Cryptosporidium*) surrounded by four membranes.

The apicomplexan parasites are transmitted by different vectors in complex life cycles. For instance, and like all other malaria parasites of the *Plasmodium* genus, *Plasmodium falciparum* spreads by infecting successively two types of hosts: humans and female Anopheles mosquitoes. In humans, the parasites grow and multiply first in the liver cells and then in the red cells of the blood. In the blood, successive broods of parasites grow inside the red cells and destroy them, releasing daughter parasites (“merozoites”) that continue the cycle by invading other red cells. The blood stage parasites are those that cause the symptoms of malaria. When certain forms of blood stage parasites (“gametocytes”) are picked up by a female Anopheles mosquito during a blood meal, they start another, different cycle of growth and multiplication in the mosquito. After 10-18 days, the parasites are found (as “sporozoites”) in the mosquito’s salivary glands. When the Anopheles mosquito takes a blood meal on another human, the sporozoites are injected with the insect’s saliva and start another human infection.

Chemotherapies are needed to fight against apicomplexan-caused diseases. These therapies generally differ with the type of parasite responsible of the infection.

In the case of malaria, this life-threatening disease affects half a billion humans in underdeveloped and developing countries. Its global heartland is Africa, with an

appalling death toll of 1 to 2 million people every year (WHO World Malaria Report, Geneva, World Health Organization, WHO/UNICEF; 2005). Endemic malaria ranges from a permanent incidence in sub-Saharan and equatorial Africa, to a seasonal but recently escalating prevalence in Southern Africa Grover-Kopec *et al.*, Malar. J. 2006, 5:38). Malaria was eradicated from temperate regions following concerted preventative sanitary actions and after important insecticide campaigns and systematic treatments with available drugs, *i.e.* quinine and chloroquine. The prophylactic programs of the 1950's and 1960's, essentially based on insecticide and drug treatments, failed to control malaria in subtropical areas. Resistance to chloroquine spread rapidly. Subsequent attempts to achieve progress in malaria prophylaxis have been characterized by the failure of vaccine development, withdrawal of some insecticides because of toxicity and negative environmental impact, the alarming spread of mosquito resistance to insecticides and of resistance of *Plasmodium* to the very few drugs that have been developed.

In an effort to improve the success rate of drug development, several approaches are being investigated. Most of the strategies are based on re-design of existing drugs, for example artemisinin, an antiparasmodial molecule from *Artemisia annua* comprising an endoperoxide moiety, and derivatives thereof such as Artesunate, which can be produced efficiently and cheaply (Renslo A. R. *et al.*, Nature Chem. Biol., 2006, 2, 701-710).

Others choose to only keep the endoperoxide moiety of artemisinin, leading to the discovery of synthetic RBx11160 (OZ277) which mimics the chemical and biological properties of this molecule and is already in clinical trials as antimalaria drug used with piperazine (Vennerstrom, J.L. *et al.*, Nature, 2004, 430, 900-904).

The novel use of combination of older drugs is also under investigation: Lapdap[®] (Chlorproguanil-dapsone) or Lapdap[®]-artesunate are based on combinations of chlorproguanil (CPG) and dapsone (DDS) and was launched in 2003 as an effective and cheap antimalarial (Mutabingwa T. *et al.*, Lancet, 2001, 358, 1218-1223).

Another well known drug is the quinolines family. Work on this old drug eventually succeeded to introduce antiparasmodial compounds such as quinoline and isoquine derivatives (Madrid, P.B. *et al.*, J. J. Med. Chem. 2007, 50, 889-896). Recently astemizole, a known antihistaminic drug was shown to have a similar activity toward *Plasmodium* than artemisinin and other derivatives (Chong, C.R., *et al.*, Nat. Chem. Biol., 2006, 2, 415-416).

Current efforts focus therefore on chemotherapy using multiple therapies including artemisinin. However, the scientific community is worried that plans for the extensive use of artemisinin might be ruined by emergence of the parasitic resistance it will

almost certainly trigger, sooner or later. Given the small number of available drugs and the resistance they have already induced, discovery of new targets and of new drugs remains a key priority.

In the case of toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii* has a broad spectrum of hosts and can virtually infect any mammal. It is well established that the final hosts are cats where sexual reproduction occurs. Transmission to humans occurs most often by infected food, or by direct or indirect contacts with cats. Severity of toxoplasmosis is very variable. In healthy human adults, infection is usually not visible besides serum analyses. Most healthy people do not require any treatment. In infected patients, the parasite remains as cysts that can reactivate a toxoplasmosis in case of immune deficiencies. Treatments are critically needed in the case of pregnant women and babies, people with HIV/AIDS and patient treated for cancer by chemotherapies. Most widely used treatments include pyrimethamine and sulfadiazine.

Because these drugs can have serious side effects for both women and babies, they are normally not used during pregnancy. Drug treatment can lessen the severity of congenital toxoplasmosis, but it will not undo any damage that has already occurred. Pyrimethamine is an anti-malarial medication also used to treat toxoplasmosis, and acts as a folic acid antagonist. It may prevent the body from absorbing the important B vitamin folate (folic acid, vitamin B-9), especially when taking high doses over a long period of time. Other potential side effects of pyrimethamine include bone marrow suppression and liver toxicity. Sulfadiazine is an antibiotic used in combination with pyrimethamine to treat toxoplasmosis. Possible side effects include nausea, vomiting and diarrhea. Pyrimethamine can also be supplied in conjunction with clindamycin, an antibiotic that can sometimes cause severe diarrhea. Patients suffering from AIDS need to take these medications for life, although in some cases, toxoplasmosis therapies can be stopped if Cluster of Differentiation 4 (CD4) count remains very high for at least three to six months. Side effects of most drugs can be more severe in people with HIV/AIDS. Toxoplasmosis is also an important veterinary infection in ovines, bovines, caprines and pigs, and is responsible for spontaneous abortion. Efficient drugs with low side effects, acting on cyst forms and usable both for human therapies and preventions in cattle farms are therefore highly needed.

The search for effective therapeutics for toxoplasmosis received much less interest and only a few examples are reported. The main target is dihydrofolate reductase (DHFR) and some inhibitors with high ligand efficiency were reported; for example starting from a QSAR analysis some authors obtained the synthesis of new 6-fluoroquinolones as potential active against *Toxoplasma gondii* (Anquetin G., *et al.*, Eur. J. Med. Chem., 2006, 41,

1478-1493).

Very recently others reported the SAR studies based on trimethoprim and methotrexate analogues. Starting from this 1960-drug they obtained high *in vitro* inhibitory activities toward a homology model of DHFR.

In the case of babesiosis, infection is similar to malaria. Transmission of *Babesia* parasites is due to bites by ticks. Wild animals (rodents and bovids) are final or intermediary parasitic reservoirs. Some *Babesia*, such as *Babesia microti* and *Babesia divergens* can infect humans. Babesiosis is reported in various domestic species, including bovids, equids, and dogs with a large spectrum of symptom, from non-severe cases to lethality. Untreated canine babesiosis is always lethal. Besides a partially efficient vaccine, no drug treatment is currently available to fight against all *Babesia* species. Human treatments include the use of quinine combined with clindamycin, or hydroxychloroquine. For veterinary purposes, bovine and equine babesiosis caused by only two species can be mainly treated, using imidocarb dipropionate.

In the case of neosporosis, data are fragmentary and poor. *Neospora* is a parasite closely related to *Toxoplasma*, capable of infecting virtually any mammal. Dog is the final host where sexual reproduction occurs. Cattles can be infected due to proximity with infected wild animals. Drugs used to treat toxoplasmosis are used to treat neosporosis.

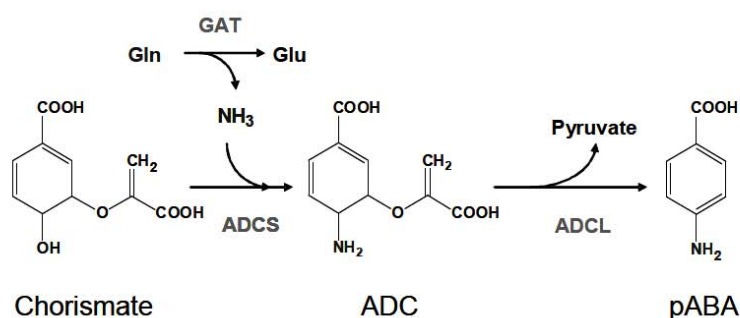
In the case of coccidiosis, tens of species of the *Eimeria* genus can cause infections of the gastro-intestinal system of birds and mammals. Coccidiosis is a very frequent plague in bovids, ovids, birds, rodents, etc. Massive poultry breeding requires prophylaxis against avian coccidiosis, particularly against *Eimeria necatrix* or *Eimeria tenella* that cause severe infections. Drug treatments include the prescription of antibiotics or non-antibiotic molecules such as decoquinate, a molecule of the hydroxyquinoline family.

Glutamine amidotransferase/aminodeoxychorismate synthase (GAT-ADCS) is known as a bifunctional enzyme of the folate pathway, involved in the synthesis of p-aminobenzoate (pABA). The GAT domain releases NH_3 from glutamine and the ADCS domain uses NH_3 to aminate chorismate. GAT-ADCS is found in all eukaryotic organisms autonomous for folate synthesis, such as parasites of the *Apicomplexa* phylum or plants.

The pABA moiety is synthesized in two steps from chorismate. In a first step, chorismate is aminated to form 4-amino-4-deoxychorismate (ADC), a reaction catalyzed by GAT-ADCS, and then ADC is aromatized with loss of pyruvate to form pABA, a reaction catalyzed by aminodeoxychorismate lyase (ADCL). The ADC synthase (ADCS) used to catalyse the amination of chorismate is an enzyme that belongs to the group of the

chorismate-utilizing enzymes, which also contains salicylate synthase, isochorismate synthase and anthranilate synthase (K. T. Ziebart *et al.*, Biochemistry 49 (2010) 2851-2859; O. Kerbarh *et al.*, Biochem. Soc. Trans. 33 (2005) 763-766). ADCS is found either as a monofunctional or bifunctional enzyme, the protein bearing in the latter case a glutamine amidotransferase (GAT) activity. Searches for inhibitors for pABA synthesis were only done with prokaryotic systems and the monofunctional form of the enzyme. They involved docking studies and design of chorismate analogous compounds (E. M. Bulloch *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 9912-9913; M. C. Kozlowski *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 2128-2140; R. J. Payne *et al.*, Org. Biomol. Chem. 7 (2009) 2421-2429; R. J. Payne *et al.*, Org. Biomol. Chem. 8 (2010) 3534-3542), combinatorial chemistry approaches associating potential inhibitors with a chorismate-like moiety that directed the molecule to the active site (K. T. Ziebart *et al.*, J. Med. Chem. 53 (2010) 3718-3729; S. Dixon *et al.*, J. Med. Chem. 49 (2006) 7413-7426), and a specific screening of a microorganism extract collection using growth inhibition of test bacteria as a marker of activity (J. Riedlinger *et al.*, J. Antibiot (Tokyo) 57 (2004) 271-279; S. Keller *et al.*, Angew. Chem. Int. Edit. 46 (2007) 8284-8286). Several compounds were identified by these different methods but appeared to be relatively weak inhibitors of ADCS (E. M. Bulloch *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 9912-9913; M. C. Kozlowski *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 2128-2140; R. J. Payne *et al.*, Org. Biomol. Chem. 7 (2009) 2421-2429; K. T. Ziebart *et al.*, J. Med. Chem. 53 (2010) 3718-3729). The most potent inhibitor of ADCS reported to date is an analogue of chorismate, *i.e.* the 2-hydroxy-4-amino-4-deoxy chorismate, exhibiting a K_i value of 38 μM with the purified enzyme (M. C. Kozlowski *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 2128-2140). But the *in vivo* effects of these ADCS inhibitors were not investigated.

The equation describing pABA synthesis is as follows:



The Inventors have now surprisingly found that a novel class of compounds of general formula (I) was able to inhibit the bifunctional enzyme GAT-ADCS with an apparent inhibitory constant (K_i) of about 10 μ M. The growth of *Arabidopsis* seedlings was inhibited by such compounds, and the addition of pABA in the external medium restored growth activity. The Inventors also observed that the compounds of formula (I) are efficient to block the invasion and proliferation processes of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts. Their efficiency was greater than that of a well-known sulfonamide compound, *i.e.* sulfadiazine, used in standard treatment of toxoplasmosis and targeting dihydropteroate synthase. These observations validate the use of GAT-ADCS as a target for anti-parasitic medicaments, and indicate that the compounds of the invention as new inhibitors having anti-folate activity could be an alternative to sulfonamides in therapies against parasites of the *Apicomplexa phylum* (toxoplasmosis, malaria).

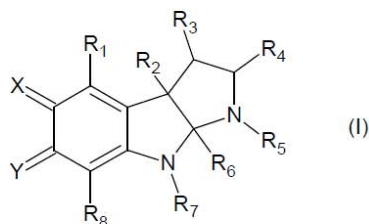
Rapidly dividing cells such as embryonic cells, tumors, bacteria and parasites rely heavily on the availability of folates. This mechanism has been exploited for the development of antifolate drugs against cancer cells and microbial or parasitic infections. Biosynthesis of folate is mainly inhibited by two groups of compounds:

- i) sulfonamides which are competitive inhibitors of dihydropteroate synthase (DHPS), an enzyme involved in the condensation of the pABA moiety with the pterin ring to form dihydropteroate, and
- ii) inhibitors of dihydrofolate reductase (DHFR), an enzyme involved in the reduction of dihydrofolate into tetrahydrofolate, the active form of folate.

Inhibitors of DHFR are commonly used as therapeutic agents for cancer (J. R. Bertino, Best Practice & Research Clinical Haematology 22 (2009) 577-582) whereas a combination of these two types of inhibitors are most often used in clinical treatments against parasites from the *Apicomplexa phylum* such as *Plasmodium falciparum* or *Toxoplasma gondii* (A. Nzila, Drug Discov. Today 11 (2006) 939-944; P. Wang *et al.*, Mol. Microbiol. 51 (2004) 1425-1438).

The Inventors have developed the subject of the present invention in order to treat some specific infections such as malaria or numerous babesiosis, or some parasitic stages that are currently resistant to drugs, such as toxoplasmic cysts.

A first subject of the invention is therefore a compound of general formula (I) below:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

- X and Y, identical or different, are selected from O, S and NR, wherein R = H or an optionally substituted alkyl radical containing 1 to 12 carbon atoms,
- R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ and R₈, identical or different, are selected from -H, -OH, -CH₂-OH and an optionally substituted alkyl radical containing 1 to 12 carbon atoms,

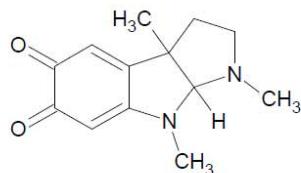
for use as a medicament.

According to a preferred embodiment, X and Y are oxygen atoms.

According to another preferred embodiment, R₂, R₅ and R₇, identical or different, are selected from -CH₃, -CH₂-OH, -C₂H₅ and -C₂H₄-OH.

According to another preferred embodiment, R₁, R₃, R₄, R₆ and R₈ are hydrogen atoms.

As a particular compound of formula (I) above, we can mentioned the rubreserine responding to the following formula:



or one of its pharmaceutically acceptable salt.

Rubreserine is an oxidation product of eseroline, eseroline being itself a degradation product of physostigmine (eserine), an indole alkaloid isolated from the Calabar bean (*Physostigma venenosum*). Rubreserin according to the invention inhibits the bifunctional GAT-ADCS involved in the biosynthesis of folates ($K_i < 10 \mu\text{M}$). It was observed that eselorine itself has no or little effect on the enzyme activity, which indicates that the carbonyl functions (o-diquinone structure) resulting from eseroline oxidation are essential to obtain the inhibitory effect. The Inventors also observed that the incubation of rubreserine with a reducing agent such as dithiothreitol (DTT) suppressed the inhibitory effect, which confirms the importance of the quinonoid structure.

Rubreserine is not commercially available but can be easily and spontaneously obtained from buffered eseroline solutions, eseroline being commercially available. Rubreserine can be prepared as described in S. T. Yang *et al.*, J. Pharm. Biomed. Anal 5 (1987) 383-393; B. Robinson, J. Pharm. Pharmacol. 17 (1965) 89-91; O. Poobrasert *et al.*, J. Nat. Prod. 59 (1996) 1087-1089. In specific conditions, eseroline can also be transformed into rubreserine in the human or animal body.

Another subject matter of the invention is a compound of formula (I) for use as a medicament for the prevention and/or the treatment in human and other mammals of parasitic disease involving apicomplexan parasites, such as *Plasmodium*, *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora*, *Cryptosporidium*, *Theileria*, *Sarcosystis*, *Eimeria* and *Gregarina*, and more preferably for the prevention and/or the treatment in human and other mammals of malaria or toxoplasmosis.

Another subject matter of the invention is a pharmaceutical composition comprising at least one compound of formula (I) as an active principle, and at least one pharmaceutically acceptable excipient.

The expression "pharmaceutically acceptable excipient" refers to any diluents, adjuvants or vehicles, such as preserving agents, fillers, disintegrating agents, wetting agents, emulsifying agents, suspending agents, solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like.

The pharmaceutical composition of the present invention may be administered by any suitable route, for example, by oral, buccal, inhalation, sublingual, nasal, percutaneous, *i.e.* transdermal or parenteral (including intravenous, intramuscular, subcutaneous and intracoronary) administration. Therefore, the pharmaceutical composition of the invention can be provided in various forms, such as in the form of hard gelatin capsules, of capsules, of compressed tablets, of suspensions to be taken orally, of lozenges or of injectable solutions or in any other form appropriate to the method of administration.

The pharmaceutical composition according to the invention includes those wherein a compound of formula (I) is administered in an effective amount to achieve its intended purpose. Determination of the effective amounts is well within the capability of those skilled in the art.

A "therapeutically effective dose" refers to that amount of compound of formula (I) which results in achieving the desired effect. Toxicity and therapeutic efficacy of compound of formula (I) can be easily determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *i.e.* for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of

the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index, which is expressed as the ratio between LD₅₀ and ED₅₀. The data obtained from such data can be used in formulating range of dosage for use in humans. The dosage of compound of formula (I) preferably lies within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage can vary within this range depending upon the dosage form employed, and the route of administration.

In the particular case of rubreserine, it was observed that the intraerythrocytic growth of *Apicomplexa* *Phylum* was strongly inhibited by said compound, with an IC₅₀ of around 1.2 μ M for *Plasmodium falciparum* (3D7 strain), showing that rubreserine exhibited anti-malarial properties. It was also observed that the effect of rubreserine was dose-dependent for *Toxoplasma gondii* (RH-YFP2 strain), the number of growth of intracellular parasites being reduced two times in the presence of 20 μ M of rubreserine. The presence of pABA or 5-formyltetrahydrofolate (5-FTHF) significantly reversed the inhibition, indicating that inhibition of pABA biosynthesis, and thus folate biosynthesis, was involved in this inhibitory process.

The exact formulation, route of administration, and dosage can be chosen by the individual physician in view of the patient's conditions. Dosage amount and interval of administration can be adjusted individually to provide plasma levels of compound of formula (I) which are sufficient to maintain the preventive or therapeutic effects.

The amount of pharmaceutical composition administered will therefore depend on the subject being treated, on the subject's weight, the severity of the affliction and the manner of administration.

For human and other mammal use, the compounds of formula (I) can be administered alone, but they are preferably administered in admixture with at least one pharmaceutically acceptable carrier, the nature of which will depend on the intended route of administration and the presentation form. Pharmaceutical composition for use according to the present invention thus can be formulated in a conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers comprising one or more excipient(s) and/or auxiliary(ies) that facilitate processing of the compounds of formula (I) into preparations which can be used pharmaceutically. Amongst the excipients and auxiliaries which can be used in the pharmaceutical composition according to the invention, one can mention anti-agglomerating agents, preservatives agents, dyes, vitamins, inorganic salts, taste-modifying agents, smoothing agents, coating agents, isolating agents, stabilizing agents, wetting agents, anti-

caking agents, dispersing agents, emulsifying agents, aromas, penetrating agents, solubilizing agents, etc., mixtures thereof and generally any excipient conventionally used in the pharmaceutical industry.

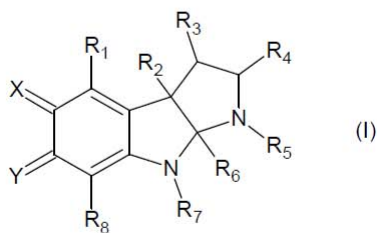
By way of example, when the pharmaceutical composition is administered orally, the carrier may comprise one or several excipients such as talc, lactose, starch or modified starches, cellulose or cellulose derivatives, polyethylene glycols, acrylic acid polymers, gelatin, magnesium stearate, animal or vegetal fats of natural or synthetic origin, paraffin derivatives, glycols, etc.

In addition to the at least one compound of formula (I), the pharmaceutical composition may also comprises one or more additional antiparasitic active principles, for example anti-malarial drugs such as for example chloroquine, quinacrine, primaquine, artemisinin, atovaquone and pyrimethamine.

For general information about the formulation and administration of pharmaceutical compositions, one can obviously refer to the book "Remington's Pharmaceutical Sciences", last edition. Of course, a person skilled in the art will take care on this occasion that the excipient(s) and/or auxiliary(ies) optionally used are compatible with the intrinsic properties attached to the pharmaceutical composition in accordance with the invention.

These pharmaceutical compositions can be manufactured in a conventional manner, *i.e.* by conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes. Proper formulation is dependent upon the route of administration chosen.

Finally, the invention also concerns the use of a compound of general formula (I) below:



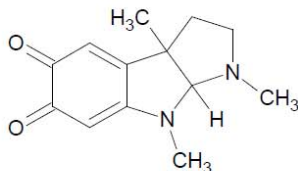
or a plant compliant salt thereof,

wherein X, Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ and R₈ are as defined above,

as an herbicide and/or an algacide, and herbicide and/or algacide compositions comprising at least one compound of formula (I) suitable for use against harmful plants in crops or useful

plants.

More preferably, the compound of formula (I) used as an herbicide and/or an algaecide, and in herbicide and/or algaecide compositions, is the rubreserine responding to the following formula:



or one of its plant compliant salt.

In addition to the above provisions, the invention also comprises other provisions which will become clear from the description which follows, which refers to examples illustrating the antiparasitic activity of a compound of formula (I), *i.e.* the rubreserine, and also to the attached drawings in which:

- **Figure 1** shows the effect of rubreserine on GAT-ADCS kinetics. **Figure 1A** represents the time-dependent efficiency of the eseroline (triplicate experiment \pm Standard Deviation (SD)). **Figure 1B** represents the time-dependent decrease of the GAT activity following the addition of 10 and 20 μ M of rubreserine. Curves were fitted using the KaleidaGraph software (Sinergy Software) and a decreasing exponential equation. **Figure 1C** shows the effect of varying Glutamine upon pABA production in the presence of 100 μ M of chorismate and 0, 4, 8 and 16 μ M of rubreserine. GAT-ADCS was first incubated with the various concentrations of rubreserine for 20 minutes, and then the kinetic was started by the addition of Glutamine, chorismate and ADCL (each point is the average of three independent measures \pm SD). Curves were fitted using the KaleidaGraph software (Sinergy Software) and the hyperbolic equation of Michaelis-Menten. **Figure 1D** represents a reverse plot of **Figure 1C**. Maximal rates of the recombinant enzyme were $130 \pm 30 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Curves were fitted using the KaleidaGraph software (Sinergy Software) and a linear regression,

- **Figure 2** shows the effect of rubreserine (Rubre) on the development of Arabidopsis seedlings. **Figure 2A** are representative experiments showing two weeks old seedlings grown in agar plates without (control) or with 50 or 100 μ M of rubreserine and in the presence or absence of 200 μ M pABA or 200 μ M 5-FTHF. **Figure 2B** shows histogram representing the estimated number of seedlings at the rosette stage in the various situations shown in **Figure 2A**. Results represent the average of four independent measures \pm SD,

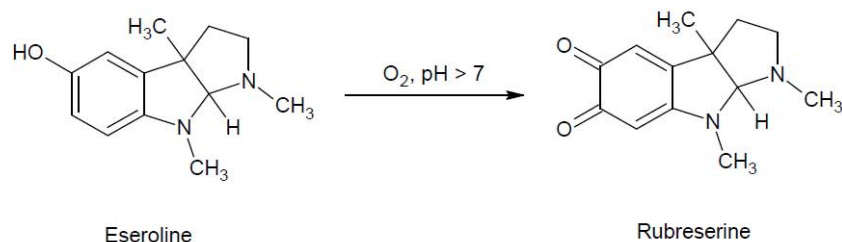
- **Figure 3** shows the effect of rubreserine (Rubre) on the invasion and proliferation processes of *Toxoplasma gondii*, and comparison with sulfanilamide (Sulfa) and sulfadiazine (SDZ). **Figure 3A** shows the invasion of human fibroblast. The parasites were first incubated with the various drugs for 5 hours, and then put in contact with the human cells for 15 minutes. The number of intracellular parasites is expressed for each experiment as a % of the number recorded in non-treated cells. **Figure 3B** shows the intracellular growth of the parasites. Intracellular proliferation was estimated 24 hours after the invasion process and expressed as the number of parasites present in the parasitophorous vacuoles. In each experiment, 200 vacuoles were counted for each drug concentration. Invasion and proliferation experiments were made in triplicate \pm SD. **Figure 3C** shows the effect of rubreserine in combination with other compounds on the intracellular proliferation of the parasite. The concentrations used were: 20 μ M rubreserine (Rubre), 0.4 μ M pyrimethamine (Pyrin), 50 μ M sulfadiazine (SDZ), 100 μ M pABA and 100 μ M 5-FTHF. The reversed effect of pABA and 5-FTHF illustrates that a blocking of folate biosynthesis was part of the inhibitory process,

- **Figure 4** shows the effect of rubreserine on the growth of *Plasmodium falciparum* (duplicate experiments).

EXAMPLES:

Preparation of rubreserine:

Eseroline can be spontaneously transformed into rubreserine in slightly alkaline solution such as bicarbonate Ringer's solution (S. Ellis *et al.*, Pharmacol., Exp. Ther. 79 (1943), 309-319). In the present study, rubreserine was prepared from commercially available (-) eseroline fumarate salt (Sigma-Aldrich, ref. E100). Stock solutions of eseroline (10 mM) were made in 50 mM phosphate buffer (pH = 8) for *Arabidopsis* and *Toxoplasma* experiments, 50 mM Tris buffer (pH = 8) for GAT-ADCS experiments, and 1 \times PBS buffer (pH = 7.5) for *Plasmodium* experiments. Under these conditions, eseroline is spontaneously oxidized into rubreserine. The formation of rubreserine was controlled through the appearance of a characteristic peak of absorption at 473 nm, a process completed in about 6 hours. Rubreserine formation was confirmed by the appearance of two resonance peaks in the carbonyl region of the ^{13}C -NMR spectrum. It was also verified by HPLC analysis that the conversion was $> 90\%$ in these conditions. These stock solutions were stored at 4°C for 48 hours or at -20°C for one week. They were serially diluted before use. Chemical structures of eseroline and rubreserine are given below:



Materials and Methods:

***Arabidopsis thaliana* cultures.**

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia) seedlings were grown on plates containing Murashige and Skoog medium, 15% agar, plus the various molecules to be tested. Seeds were first sterilized by soaking for 15 minutes in a solution containing 0,095% Tween® 20 and 0,57% sodium hypochlorite before to be laid on the agar medium. The plates were conserved in the dark at 4°C for 48 hours, and then transferred in a green house (20°C, 80% humidity, 150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 12 hours light period). The number of seedlings at the two leaf stage (rosette stage) was counted after 2 weeks.

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia) cell suspension cultures were grown under continuous light (40 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) at 23°C with rotary agitation at 125 rpm in Gamborg's B5 medium supplemented with 1 μM 2-naphtalene acetic acid and 1.5% (w/v) sucrose. Cells were sub-cultured every 7 days in fresh medium. For measurements of metabolites, cells were collected after 7 days of treatment, rapidly washed with distilled water, weighted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for later analyses.

***Toxoplasma gondii* cultures.**

Toxoplasma gondii tachyzoites (RH-YFP2 strain) were propagated in human foreskin fibroblasts (HFFs). Human cells were grown in DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 2 mM glutamine, and 10% FBS (Gibco). To obtain extracellular parasites, host cells were forced through a 26.5 gauge needle, and then the released parasites were purified by filtration through a 3 μm polycarbonate membrane before use.

For the invasion assay, RH-YFP2 parasites were incubated for 5 hours with the different drugs. Then 10^6 parasites/well were centrifuged for 30 seconds at 1300 rpm on HFF monolayers to synchronize invasion and wells were incubated for 15 minutes in a water bath at 37°C. Wells were washed three times with cold PBS to eliminate extracellular parasites and cells were fixed in 2.5% formaldehyde/PBS for 30 minutes and stored in PBS at 4°C until staining. To distinguish intracellular from extracellular parasites, cells were

incubated with the primary antibody mAb Tg05-54 to detect the major *Toxoplasma* surface protein SAG1 (TgSAG1), then with Texas Red-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes). Intracellular parasites exhibit a faint red colour and can easily be distinguished from extracellular parasites which are bright red. Nuclei were stained with Hoechst 33258 (Molecular Probes). To determine the number of intracellular parasites, 12 randomly selected fields were counted per well and per experiment with a Zeiss Axioplan 2 microscope equipped for epifluorescence and phase-contrast. Invasion was expressed as % of the number of intracellular parasites recorded in non-treated cells.

For the proliferation assay, 10^5 parasites/well were centrifuged on HFF monolayers for 30 seconds at 1300 rpm and incubated for 15 minutes in a water bath at 37°C for invasion. Wells were then washed three times with PBS to eliminate extracellular parasites and drugs were added. After 24 hours at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, cells were fixed as described above. The number of parasites from up to 200 individual vacuoles was counted for each drug concentration.

***Plasmodium falciparum* cultures.**

The 3D7 strain of *Plasmodium falciparum* was maintained in O+ blood. A rubreserine 10 mM stock concentration was made up in 1 × PBS pH = 7.5. This stock solution was then diluted serially to obtain the growth curve. Growth inhibition was measured after 96 hours by using an *in vitro* SYBR Green 1-based fluorescence growth assay, as previously described (T. N. Bennett *et al.*, Antimicrob. Agents Chemoter. (2004) 48 1807-1810; M. Smilkstein *et al.*, Antimicrob. Agents Chemoter. (2004) 18 1803-1806).

Expression and purification of the recombinant AtGAT-ADCS and EcADCL:

Both proteins were expressed and purified as described in the publication of D. Camara *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics 505 (2011) 83-90.

Determination of GAT-ADCS activities:

GAT-ADCS activity can be determined by measuring the production of either glutamate or pABA. Standard assays contained 100 mM Tris/HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 5% V/V glycerol, 0 to 0.5 mM L-glutamine, 0.1 mM chorismate, 9 µg ml⁻¹ (90 nM) of the recombinant *Arabidopsis thaliana* GAT-ADCS and either 1 mM NAD and an excess of glutamate deshydrogenase (GDH) for glutamate determination, or an excess of *Escherichia coli* ADCL (20 µg ml⁻¹, 600 nM) for pABA determination. Reactions (final volume 80 µl) were run in the wells of a 96 well microplate (Greiner) and changes in fluorescence were

continuously monitored with a microplate scanning spectrophotometer Safir 2 (Tecan). The glutamate production was followed by the fluorescence emission of NADH at 450 nm (excitation 340 nm). The pABA production was directly followed by the increase of the fluorescence emission at 340 nm (excitation 290 nm).

High throughput screening:

The equipment involved an automated screening station (Tecan Genesis 2000, Lyon, France), including a microplate reader. The platform is controlled by software for driving of serial devices and assays scheduling (Tecan Gemini 4.2 and FACTS 4.82 software). The library of compounds was purchased from The Prestwick Chemical Library®. This library contains 1200 molecules, 100% being marketed drugs, supplied at a 5 mM concentration in DMSO. The final concentration used in the enzymatic assay was 100 μ M, and it was verified in separate control experiments that 2% DMSO had no effect on the activity. The enzymatic test used to determine GAT-ADCS activity in primary and secondary screenings was based on glutamate determination, as described above. After optimization of the assay, the Z' factor was comprised between 0.68 and 0.84.

Results:

GAT-ADCS inhibition:

Eseroline was identified by high throughput screening of The Prestwick Chemical Library®. When GAT-ADCS was incubated with a fresh solution of eseroline, the rate of inhibition increased with the age of the solution (see **Figure 1A**), indicating that inhibition was linked to the pH-dependent transformation of eseroline into rubreserine (see Material and Methods). **Figure 1A** also illustrates that eseroline has to be transformed into rubreserine before becoming an active compound. The rate constant inhibition for rubreserine k_i was rather low and a 20 minutes period of incubation was required to obtain maximal inhibition (see **Figure 1B**). Rubreserine decreased the V_m for pABA production and increased the K_m for glutamine, indicating a mixed-type inhibition (see **Figures 1C and 1D**). The kinetic constants K_i and αK_i calculated from such pattern of curves were estimated to be respectively 4 and 9 μ M. In control experiments it was verified that rubreserine had no effect on ADCL and that inhibition is solely imputable to a decrease of GAT-ADCS activity.

Effect of rubreserine on *Arabidopsis thaliana*:

When *Arabidopsis thaliana* seedlings were grown on agar plates in the presence of various concentrations of rubreserine, a dose-dependent growth inhibition was observed (see **Figures 2A and 2B**). When the agar plates were supplemented with 200 μ M pABA together with rubreserine, the inhibition was suppressed or largely reduced (see **Figure**

2B). This indicated that growth in the presence of rubreserine was limited by pABA synthesis. Because pABA is required for folate biosynthesis, we also measured the potential impact of 5-formyl tetrahydrofolate on rubreserine-treated plants (see **Figure 2B**). This folate derivative was also able to revert the inhibitory effect of rubreserine, but to a lower extent than pABA.

Effect of rubreserine on *Toxoplasma gondii*:

Firstly, it was verified that rubreserine concentrations up to 50 μM had no effect on confluent human fibroblast cells. The effect of rubreserine on *Toxoplasma gondii* parasites was then studied in two situations:

- i) in invasion of human fibroblasts, and
- ii) in intracellular development of the parasites.

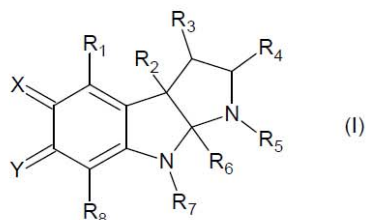
As shown in **Figure 3A**, invasion of human cells strongly decreased when the parasites have been first incubated for 5 hours with various rubreserine concentrations, and then put in contact with the human cells for 15 minutes. This effect was dose-dependent, the number of intracellular parasites being reduced two times in the presence of 20 μM rubreserine. Likewise, intracellular proliferation was estimated 24 hours after the invasion process and expressed as the number of parasites present in the parasitophorous vacuoles. In each experiment, 200 vacuoles were counted for each drug concentration. When parasited cells were placed in the presence of the inhibitor, the number of parasites in the parasitophorous vacuoles decreased, which is representative of a slowing down of the parasite intracellular division (see **Figure 3B**). This effect was reversed by pABA as shown in **Figure 3C**. Also shown in **Figures 3A and 3B**, is the comparison between rubreserine, and two sulfonamide drugs, sulfanilamide and sulfadiazine. Indeed, sulfadiazine is widely used in standard treatment to cure toxoplasmosis. Interestingly, rubreserine appeared more efficient than the two sulfa- drugs on either the invasion of human fibroblasts or the intracellular replication of the parasites. From these curves, an IC_{50} for rubreserine of about 20 μM can be calculated, a value lower than the IC_{50} for sulfadiazine estimated from this study ($> 50 \mu\text{M}$) or generally reported in the literature ($> 30 \mu\text{M}$) (P. Meneceur, Antimicrob. Agents Chemother. 52 (2008) 1269-1277). The presence of 100 μM pABA or 100 μM 5-FTHF significantly reversed the inhibition, indicating that inhibition of pABA biosynthesis (and thus of folate biosynthesis) was involved in the inhibitory process (see **Figure 3C**). When rubreserine 20 μM was used in combination with pyrimethamine 0.4 μM , the inhibition was increased compared to rubreserine alone. Such a combination appeared as much efficient as a mixture combining 50 μM sulfadiazine and 0.4 μM pyrimethamine (see **Figure 3C**).

Effect of rubreserine on *Plasmodium falciparum*:

Rubreserine was also tested on *Plasmodium falciparum*. As shown on **Figure 4**, rubreserine exhibited anti-malarial properties, since the intraerythrocytic growth of the parasite was strongly inhibited by rubreserine, with an IC_{50} of around 1.2 μ M.

CLAIMS

1. A compound of general formula (I) below:

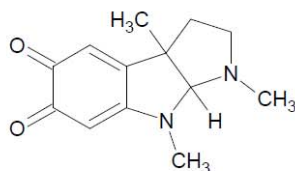


or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

- X and Y, identical or different, are selected from O, S and NR, wherein R = H or an optionally substituted alkyl radical containing 1 to 12 carbon atoms,
- R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ and R₈, identical or different, are selected from -H, -OH, -CH₂-OH and an optionally substituted alkyl radical containing 1 to 12 carbon atoms,

for use as a medicament.

2. The compound according to Claim 1, wherein X and Y are oxygen atoms.
3. The compound according to Claim 1 or Claim 2, wherein R₂, R₅ and R₇, identical or different, are selected from -CH₃, -CH₂-OH, -C₂H₅ and -C₂H₄-OH.
4. The compound according to Claims 1 to 3, wherein R₁, R₃, R₄, R₆ and R₈ are hydrogen atoms.
5. The compound according to Claims 1 to 4, wherein said compound of formula (I) is the rubreserine responding to the following formula:



or one of its pharmaceutically acceptable salt.

6. The compound according to Claims 1 to 5, for use as a medicament for the prevention and/or the treatment of parasitic diseases involving apicomplexan parasites.
7. The compound according to Claim 6, wherein said apicomplexan parasites are selected from *Plasmodium*, *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora*, *Cryptosporidium*, *Theileria*, *Sarcosystis*, *Eimeria* and *Gregarina*.
8. The compound according to Claims 1 to 5 for use as a medicament for

the prevention and/or the treatment of malaria.

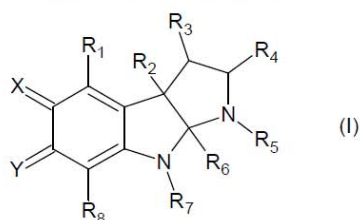
9. The compound according to Claims 1 to 5 for use as a medicament for the prevention and/or the treatment of toxoplasmosis.

10. A pharmaceutical composition comprising at least one compound of formula (I) as defined according to Claims 1 to 9 as an active principle, and at least one pharmaceutically acceptable excipient.

11. The pharmaceutical composition of Claim 10, wherein it further comprises at least one additional antiparasitic active principle.

12. The pharmaceutical composition of Claim 11, wherein said additional antiparasitic active principle is selected from chloroquine, quinacrine, primaquine, artemisinin, atovaquone and pyrimethamine.

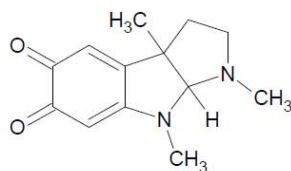
13. Use of a compound of general formula (I) below:



or a plant compliant salt thereof,

wherein X, Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ and R₈ are as defined according to Claims 1 to 4, as an herbicide and/or an algaecide.

14. Use according to Claim 13, wherein said compound of formula (I) is the rubreserine responding to the following formula:



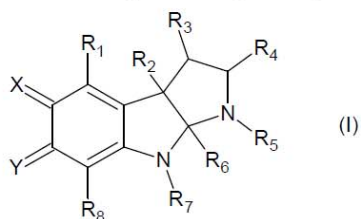
or one of its plant compliant salt.

15. An herbicide and/or algaecide composition comprising at least one compound of formula (I) as defined according to Claim 13 or Claim 14.

COMPOUNDS WITH ANTIPARASITIC ACTIVITY AND APPLICATIONS THEREOF

ABSTRACT

The invention relates to novel compounds responding to the following formula (I):



or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

for use as medicaments, and in particular as medicaments for the prevention and/or the treatment of parasitic diseases caused by apicomplexans parasites. The invention also concerns pharmaceutical compositions containing such compounds of formula (I) as active principles. Finally, the present invention relates to the use of compounds of formula (I) as herbicides and/or algaecides and to herbicide and/or algaecide compositions containing such compounds.

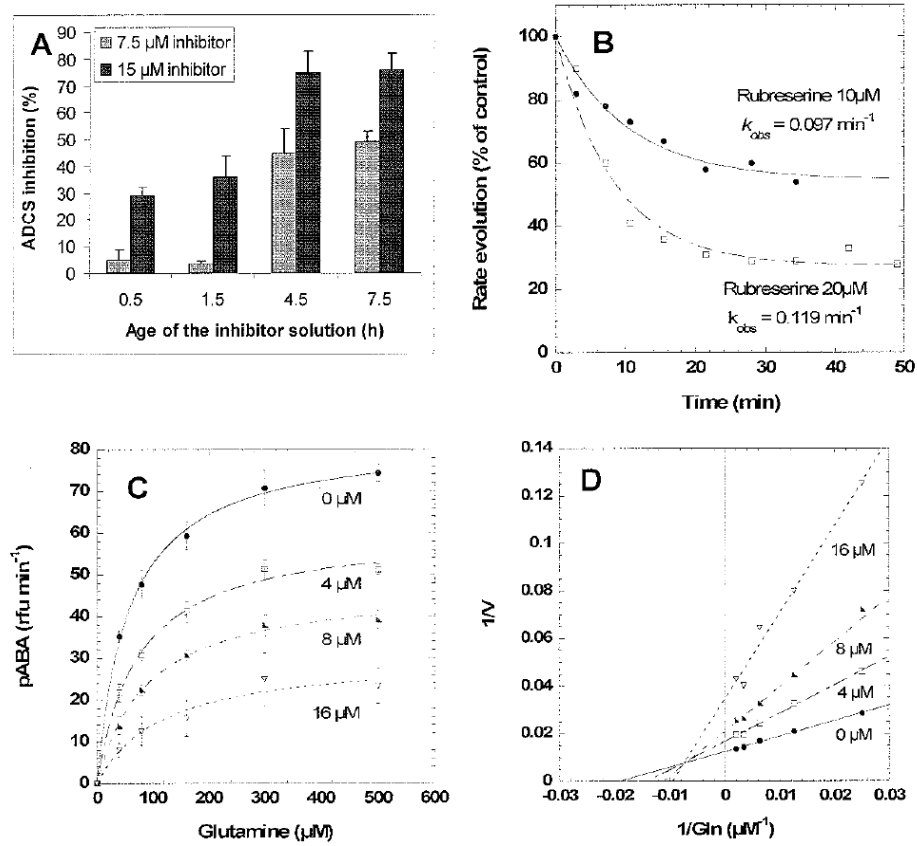


FIGURE 1

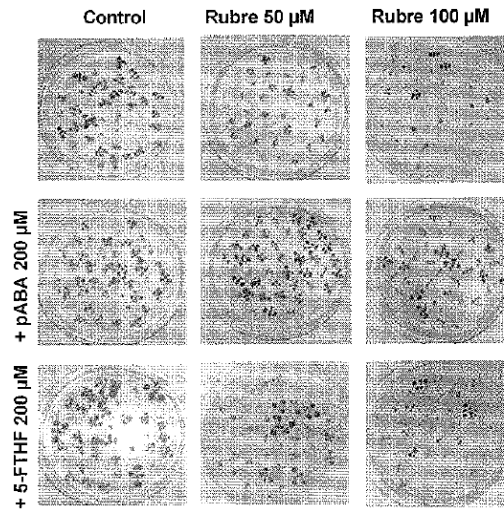
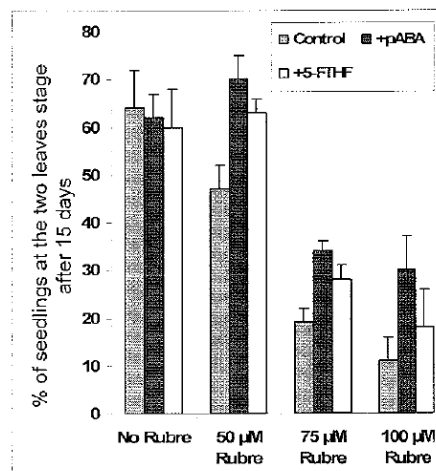
A**B**

FIGURE 2

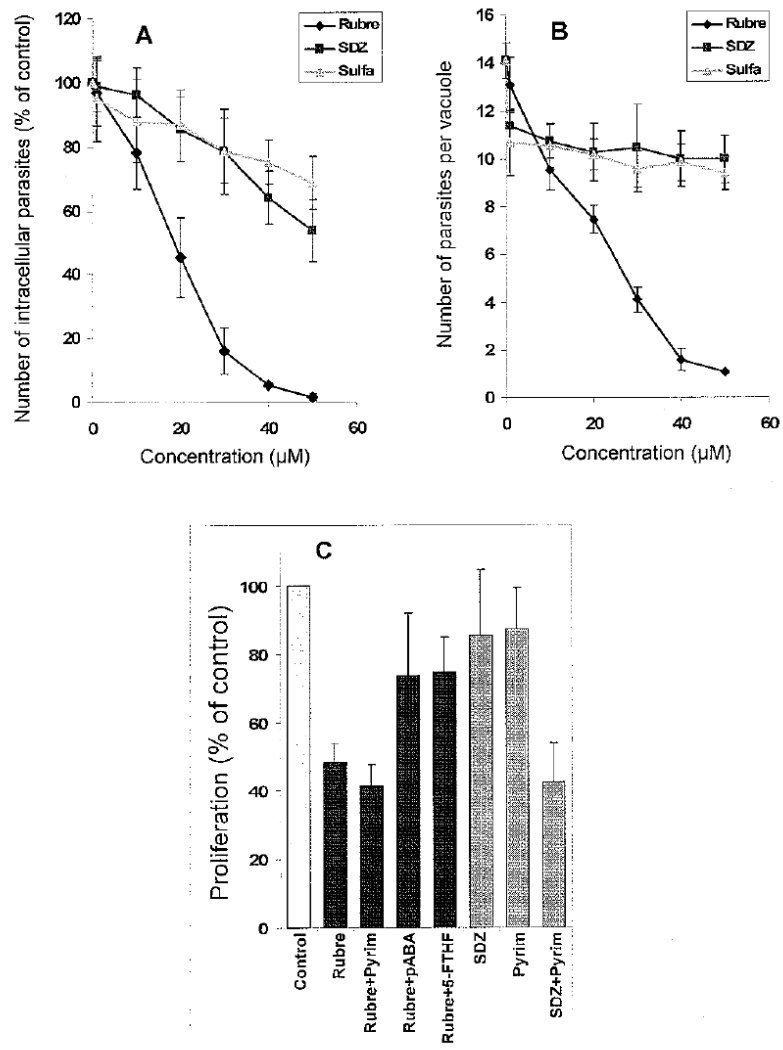


FIGURE 3

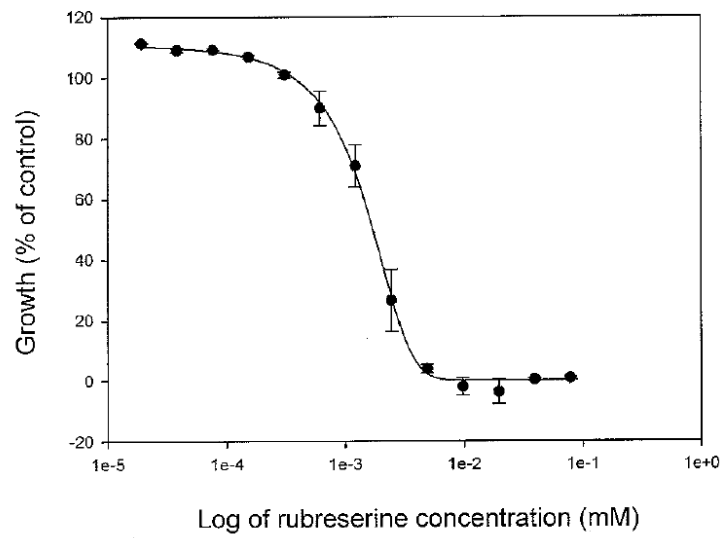


FIGURE 4

Résumé

Le terme folate (vitamine B9) désigne une famille de molécules ayant une structure de base composée de 3 parties : un noyau pterine, un acide para-aminobenzoïque (pABA) et une chaîne de glutamates. Le rôle de ces cofacteurs est de transporter des groupements monocarbonés. Ils interviennent dans de nombreuses réactions comme la synthèse des bases nucléiques, la synthèse de méthionine et la synthèse et le turnover de la S-adenosylmethionine. Le folate est synthétisé chez les plantes et un grand nombre de micro-organismes dont les parasites du phylum des apicomplexes, tels que *Plasmodium falciparum*, et *Toxoplasma gondii*. Les enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse étant absentes chez l'homme, elles représentent des cibles herbicides, antibiotiques et antiparasitaires potentielles. Les inhibiteurs de la voie de biosynthèse du folate (tels que les sulfamides, analogues du pABA et inhibiteurs de la dihydroptéroate synthase, ou les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase), sont souvent utilisés comme antibiotiques et antiparasitaires. Un problème majeur dans le traitement de ces maladies infectieuses est la résistance développée contre ces molécules, ce qui nécessite la recherche permanente de nouveaux médicaments.

Le pABA est synthétisé en plusieurs étapes qui sont autant de cibles intéressantes pour développer de nouveaux inhibiteurs. Tout d'abord l'aminodeoxychorismate (ADC) synthase transforme le chorismate en ADC, puis dans une seconde étape, l'ADC est transformé en pABA par une ADC lyase. Chez les plantes supérieures et les parasites apicomplexes l'ADC synthase est une enzyme bifonctionnelle composée de deux grands domaines, un domaine glutamine amidotransférase (GAT) qui permet de produire le NH_3 nécessaire à l'amination du chorismate, et un domaine ADC synthase (ADCS). Nous avons pu déterminer les paramètres cinétiques de la GAT-ADCS d'*Arabidopsis*. Nous avons constaté que ces deux domaines fonctionnent indépendamment, c'est-à-dire soit en présence de glutamine seule pour le domaine GAT (pas de chorismate), soit en présence de chorismate et de NH_3 pour le domaine ADCS (pas de glutamine). Toutefois, le fonctionnement en tandem des deux domaines (tous les substrats sont présents) améliore les propriétés cinétiques (k_{cat}) de chacun d'eux. Nos résultats montrent aussi que le NH_3 produit par le domaine GAT et nécessaire à la synthèse de l'ADC n'est pas relargué dans le milieu extérieur mais canalisé (channeling) vers le domaine ADCS. Finalement, nous avons observé que l'ADC, produit final de la réaction, retro-inhibe le domaine ADCS en absence d'ADC lyase. Pris dans son ensemble, nos résultats indiquent que l'amination du chorismate est l'étape la plus limitante de la synthèse du pABA,...

Des expériences de criblage à haut débit nous ont permis d'identifier une molécule, la rubreserine, qui inhibe *in vitro* le domaine GAT de l'ADC synthase d'*Arabidopsis* avec un K_i autour de 8 μM . Nous avons observé que cette molécule inhibe la croissance de plantules d'*Arabidopsis thaliana* et la prolifération des parasites *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* avec des IC_{50} respectif de 65 μM , 20 μM et 1.2 μM . Chez *Arabidopsis*, la concentration en folate des cellules traitées est abaissée d'environ 40% par rapport au contrôle, une diminution qui n'a plus lieu en présence de pABA. L'ajout de pABA et de 5-formyltetrahydrofolate dans les milieux de culture d'*Arabidopsis* ou de *Toxoplasma* supprime en grande partie l'inhibition de croissance liée à la rubreserine, ce qui montre bien la connexion entre rubreserine et voie de biosynthèse du folate. Avec *Toxoplasma gondii*, la rubreserine apparaît plus efficace que les sulfamides pour bloquer l'invasion et la prolifération de ces parasites dans les fibroblastes humains. Ces résultats valident la GAT-ADCS comme cible anti-folate et montrent que la rubreserine a des propriétés anti-parasitaires intéressantes.

Abstract

The term folate (vitamin B9) is a family of molecules with a basic structure composed of 3 parts: a core pterin, a para amino benzoic acid (PABA) moiety and a chain of glutamate. The role of these cofactors is to carry one-carbon groups. They are involved in many reactions such as the synthesis of nucleic acids, the synthesis of methionine and the synthesis and turnover of S-adenosylmethionine. Folate is synthesized in plants and many micro-organisms including parasites of the *Apicomplexa* phylum such as *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*. Several enzymes involved in the pathway are absent in humans, and so they are potential targets for herbicide, antibiotic and antiparasitic drugs. Inhibitors of folate biosynthesis (such as dihydropteroate synthase inhibitors, or inhibitors of dihydrofolate reductase), are often used as antibiotics and pesticides. A major problem in treating these infectious diseases is the resistance developed against these molecules, which requires a constant search for new drugs.

pABA is synthesized in several steps which are all attractive targets for developing new inhibitors. First the aminodeoxychorismate (ADC) synthase converts chorismate into ADC, and then, in a second step, the ADC is converted to pABA by an ADC lyase. In higher plants and apicomplexan parasites the ADC synthase is a bifunctional enzyme composed of two main domains: a glutamine amidotransferase (GAT) domain that produces NH_3 , and an ADC synthase domain (ADCS) that catalyzes the amination of chorismate. We determined the kinetic parameters of the *Arabidopsis* GAT-ADCS. We found that these two domains function independently, that is to say either in the presence of glutamine alone for the GAT domain (no chorismate) or in the presence of chorismate and NH_3 for the ADCS domain (no glutamine). However, the tandem operation of the two domains (all substrates are present) improves the kinetic properties (k_{cat}) of each one. Our results also show that the NH_3 produced by the GAT domain and required for the synthesis of ADC is not released into the surroundings but rather channeled to the active site of ADCS. Finally, we observed that ADC, the final product of the reaction, retro-inhibits the ADCS domain in the absence of ADC lyase. Taken together, our results indicate that the amination reaction of chorismate is the most limiting step of the synthesis of pABA.

Using high-throughput screening approaches we have identified a molecule, rubreserine, which inhibits *in vitro* the GAT domain of *Arabidopsis* GAT-ADCS with a K_i value around 8 μM . We observed that this molecule inhibits the growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings and the proliferation of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* parasites with respective IC_{50} of 65 μM , 20 μM and 1 μM . In *Arabidopsis*, the concentration of folate in rubreserine-treated cells is lowered by about 40% compared to controls, a decrease that is suppressed in the presence of pABA. The addition of pABA and 5-Formyltetrahydrofolate in the culture media of *Arabidopsis* and *Toxoplasma* partly reverses the growth inhibition due to rubreserine, which shows the connection between the drug and folate biosynthesis. Rubreserine appears more effective than sulfa-drugs to block the invasion and proliferation of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts. These results validate the GAT-ADCS as an anti-folate target and show that rubreserine has interesting anti-parasitic properties.